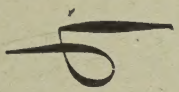
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
Année 1971 N° 30

AUTO-HISTO-RADIOGRAPHIE



THÈSE

pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en Mai 1971
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

KREMER Gérard, Marie, Nicolas

Né le 26 novembre 1947, à Montbron (Charente)

JURY

Président : M. DOUSTE-BLAZY, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs : M. VAN HAVERBEKE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

M. RICO, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Imp. J. Owen - Nérac
1971

AUTO-HISTO-RADIOGRAPHIE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0088

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
Année 1971 N° 30

AUTO-HISTO-RADIOGRAPHIE

THÈSE
pour le
DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en Mai 1971
devant
l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

KREMER Gérard, Marie, Nicolas
Né le 26 novembre 1947, à Montbron (Charente)

JURY

Président : M. DOUSTE-BLAZY, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs : M. VAN HAVERBEKE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

M. RICO, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Imp. J. Owen - Nérac
1971

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Directeur :
M. FLORIO.

Directeurs Honoraires :
MM. PONS, DARRASPEN.

Professeur Honoraire : M. LOMBARD.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie :

	M.
Professeur titulaire	GODFRAIN
	Mme
Maître-Assistant	BURGAT-SACAZE

Pharmacie - Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales :

	MM.
Professeur titulaire	RICO
Maître-Assistant agrégé	LORGUE

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale

Chaire d'anatomie des animaux domestiques :

Professeur titulaire	PAVAUX

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique :

Professeur titulaire	RUCKEBUSCH
Maître-Assistant agrégé	FARGEAS

Physiologie
Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique :

Professeur titulaire	VAN HAVERBEKE
Maître de Conférences, non Chef de Service, Professeur sans Chaire	CABANIE

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

UNIV. LEIDEN BIBL.

Chaire d'Hygiène et d'Industrie des aliments d'origine animale:

MM.

Professeur titulaire . . .. LABIE

Maître-Assistant . . .. EECKHOUTTE

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de parasitologie et maladies parasitaires:

Professeur titulaire . . .. BRIZARD

Maître-Assistant . . .. DORCHIES

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de sémiologie et pathologie médicale des équidés et carnivores:

Professeur titulaire . . .. FLORIO

Maître de Conférences, non Chef de Service, Professeur sans Chaire ..... LESCURE

Maître-Assistant . . .. GUELFI

Sémiologie et Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores - Législation vétérinaire et déontologie - Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour:

Professeur titulaire . . .. TOURNUT

Maître de Conférences, non Chef de Service, Professeur sans Chaire ..... ESPINASSE

Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale:

Professeur titulaire . . .. N...

Maître de Conférences, Chef de Service ..... CAZIEUX

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Technique chirurgicale
Pathologie chirurgicale
Podologie - Clinique

Chaire de Pathologie de la Reproduction:

Professeur titulaire . . .. BERTHELON

Maître de Conférences, non Chef de Service,

Professeur sans Chaire ..... ROYAL

Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la reproduction
Obstétrique - Clinique

Chaire de maladies contagieuses - Zoonoses - Législation sanitaire:

Professeur titulaire . . .. SAURAT

Maître-Assistant . . .. CHANTAL

Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation sanitaire

Chaire de Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie:

	MM.
Professeur titulaire	LAUTIE

Microbiologie - Immunologie
Pathologie générale

Chaire de Zootechnie et d'Economie Rurale:

Professeur titulaire	QUEINNEC
Maître-Assistant	DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée
Hygiène générale
Zootechnie - Elevage
Economie générale et des productions animales

Chaire d'Alimentation:

Professeur titulaire	FALIU
Maître-Assistant agrégé	GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

Antibio-Thérapie des Maladies infectieuses	MONNIER
Aspect médical des Zoonoses	ARMENGAUD
Energétique	LABOUCHE
Initiation à l'informatique biomédicale	FERNET
Agronomie	COMBRET
Métabolismes	RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891, et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A notre Président de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.

Hommages respectueux.

A notre Jury de Thèse:

MONSIEUR LE PROFESSEUR VAN HAVERBEKE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

qui nous a encouragé et guidé dans le choix de cette thèse.
Témoignage de reconnaissance et de respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR RICO

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

pour l'honneur et le plaisir qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de notre Jury de Thèse.
Témoignage de respectueuse gratitude.

A TOUS NOS MAITRES

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

INTRODUCTION

On désigne sous le nom d'autoradiographie une technique qui vise à détecter et éventuellement à doser dans un corps des radioisotopes par l'image que produisent leurs éléments de désintégration sur une plaque photographique.

On distingue :

— l'autoradiographie par noircissement où l'on observe une tache noire en regard du centre de désintégration ;

— l'autoradiographie par trajectoires individuelles où le déplacement de la particule impressionne plusieurs grains de l'émulsion photographique, d'où une traînée de points correspondant à la trajectoire de celle-ci.

L'histo-autoradiographie est par définition l'application de cette technique à l'histologie, le corps autoradiographié étant en l'occurrence une cellule ou un tissu.

Un historique sommaire de l'histo-autoradiographie doit mentionner les dates suivantes :

1896, Becquerel découvre la radioactivité.

1902, Curie, Bouchard et Balthazar montrent la présence du radium chez un animal ayant vécu en athmosphère contaminée par celui-ci.

1924, Lacassagne et M^{me} Lattès réalisent des coupes autoradiographiques sur des organes de Rat injectés au polonium.

1933, Cettler et Norris reprennent ces travaux sur matériel humain.

Ce n'est que depuis la fin de la seconde guerre mondiale que l'histo-autoradiographie fait l'objet de recherches systématiques (1947) Gross et Leblond (1948) Axelrod et Hamilton, etc...

Notre étude comprendra trois parties :

— données générales et théoriques sur l'histo-autoradiographie ;

— techniques autoradiographiques ;

— application de différents isotopes à l'autoradiographie.

Enfin, dans un bref appendice nous avons situé les perspectives d'utilisation de l'autoradiographie en cytochimie et en microscopie électronique.

Nous rappellerons auparavant un certain nombre de définitions particulièrement utiles :

— La période T d'un élément radioactif est le temps au terme duquel le nombre N des atomes non désintégrés est égal à la moitié du nombre initial No des atomes. Si la loi de décroissance radioactive est $N = No\ e^{-\lambda t}$ alors $T = \frac{0{,}693}{\lambda}$ λ étant la constante radioactive.

— Le curie est la quantité de n'importe quelle substance radioactive dont $3{,}7 \times 10^{10}$ noyaux se désintègrent par seconde, quelle que soit la nature des particules émises.

— L'électron volt (e V) est l'énergie cinétique acquise par un électron dont la vitesse initiale est nulle quand la tension accélératrice est de 1 volt.

ÉTUDE GÉNÉRALE ET THÉORIQUE DE L'AUTORADIOGRAPHIE

I. — ETUDE DES DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENT UTILISES

Seuls les émetteurs α et β sont retenus pour les études autoradiographiques et dans certains cas les isotopes qui se désintègrent par capture K. Le rayonnement γ est trop pénétrant et provoque une ionisation trop faible pour impressionner les émulsions photographiques.

A) Les particules α.

Les particules α sont des noyaux d'hélium chargés positivement. Elles sont relativement lourdes, à faible pouvoir de pénétration et produisent un nombre élevé d'ionisations par unité de longueur. Un radioisotope α produit des particules de même énergie.

Dans les émulsions autoradiographiques, leurs trajectoires apparaissent comme des traits courts et droits de grains étroitement espacés. Les trajectoires sont facilement tracées à travers l'émulsion autoradiographique à partir de leur point d'origine. La précision avec laquelle on peut déterminer ce point en autoradiographie est la plus élevée qui soit avec ce type de rayonnement.

Les doses optimales pour leur étude sont alors de 10^3 à 10^6 traces par cm^2. Au-delà de 10^7 trajectoires par cm^2, l'observation individuelle des traces devient impossible et on tombe alors dans le domaine de l'autoradiographie par noircissement.

Il est à remarquer que l'utilisation des émetteurs α dans les études biologiques est limitée, depuis l'apparition de nouveaux isotopes situés principalement à la fin du tableau périodique.

	E max (MeV)	e max (mg/cm²)
Br^{80}	$4,75 \times 10^{-2}$	2,75
$Ag^{107,109}$	$9,5 \times 10^{-2}$	11
Rb^{87}	$1,3 \times 10^{-1}$	20
Cb^{95}	$1,5 \times 10^{-1}$	30
Lu^{176}	$2,20 \times 10^{-1}$	49
Ac^{224}	$2,25 \times 10^{-1}$	50
Co^{60}	3×10^{-1}	80
Zr^{95}	4×10^{-1}	$1,2 \times 10^{2}$
I^{131}		
Cu^{64}	6×10^{-1}	$2,2 \times 10^{2}$
Sb^{124}	$4,5 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{2}$
Ba^{140}	1,1	4×10^{2}
Cd^{115}	1,3	5×10^{2}
Sr^{89}	1,5	7×10^{2}
P^{32}	1,7	8×10^{2}
T^{129}		
Y^{90}	2,2	10^{3}
Sb^{124}	2,5	$1,2 \times 10^{3}$
Pr^{144}	3	$1,6 \times 10^{3}$
Cl^{38}	5	$2,4 \times 10^{3}$

(1) Energie maximale de différents émetteurs et pouvoir de pénétration maximum de leurs particules.

B) Les particules β (électrons).

Comparées aux particules α, les particules β sont plus légères, ont une trace plus longue avec un nombre plus faible d'ionisations par unité de longueur et sont plus facilement déviées de leur trajectoire. Leur trajectoire est d'ailleurs plus imprévisible que celle des particules α et le nombre d'ionisations qu'elles produisent par unité de longueur augmente au fur et à mesure que leur énergie diminue. Les rayons β qui pénètrent la matière sont absorbés. Cette absorption ne dépend que de l'épaisseur du corps qui les absorbe mesurée en mg par cm^2 et non de ses caractéristiques chimiques. Toutefois dans le domaine des nombres atomiques élevés, cette relation n'est pas exactement vérifiée. Des couches d'absorption relativement minces absorbent la plupart des particules β émises par un radioisotope.

En effet la distribution des énergies

Soit une particule β d'énergie maximale E max $= 1/2\ mV^2$ max arrivant perpendiculairement à l'émulsion. Cette particule est d'abord ralentie, elle émulsionne des grains d'AgBr et s'arrête après avoir traversé une épaisseur e, on appelle par définition cette épaisseur « épaisseur maximale » car nous sommes en droit de garantir que cette émulsion arrêtera toute autre particule d'énergie (et par conséquent de vitesse) inférieure à E max, l'abordant sous des angles inférieurs à 90° (et ayant par conséquent davantage de parcours à franchir). Cette « épaisseur maximale » dépend du petit nombre de particules ayant la plus haute énergie et seulement de celles qui par chance ont une trajectoire relativement linéaire. A cause de la répartition statistique des particules β et de la distribution continue de leur énergie, une couche d'absorption (en l'occurrence une émulsion) beaucoup plus fine qui est suffisante pour absorber la plupart des particules β.

La relation entre l'énergie maximale (E max) et l'épaisseur maximale e est montrée sur le tableau.

On remarquera qu'il existe une grande différence dans l'énergie maximale pour différents émetteurs : pour le ^{32}P elle est de 1.700 ke V, pour ^{3}H de 18 ke V seulement.

Cette notion est d'un intérêt certain en ce qui concerne le pouvoir de résolution en autoradiographie.

C) La capture K et la transition isométrique.

Les isotopes se désintégrant par capture K sont également appropriés pour les expériences autoradiographiques. L'absorption d'un électron de la couche K par le noyau atomique conduit à la formation d'un trou dans cette couche. Ce trou est rempli

alors par un électron de la couche immédiatement supérieure provoquant l'émission de rayons X. Dans les éléments de faible poids atomique, aux alentours de 50, les rayons X ont une très grande probabilité d'être absorbés par une couche électronique du même atome. Cela conduit à des émissions électroniques (électrons Auger) d'énergie comparable à ceux produits par le tritium. Un même phénomène se produit avec les isotopes qui se désintègrent par transition isomérique.

Dans ce cas un quantum γ de basse énergie est émis par le noyau atomique. Une partie de ces quantums γ sont absorbés par la couche K du même atome conduisant à des émissions électroniques de basse énergie. Ultérieurement le trou dans la couche K provoque une émission de séries de rayons X provoquant l'émission d'électrons Auger. Des isotopes à électrons secondaires ayant une énergie aussi faible que l'énergie β du tritium ont un pouvoir de résolution correspondant élevé.

II. — PROCESSUS PHOTOGRAPHIQUE

Rappel sur la structure électronique d'un cristal :

— un atome isolé est caractérisé par une suite discontinue de niveaux d'énergie ;

— si n atomes s'assemblent chaque niveau est remplacé par n sous niveaux d'énergie ;

— quand n tend vers l'infini (cas d'un cristal) chaque niveau d'énergie est remplacé par une bande d'énergie. Entre 2 sous niveaux infiniment voisins E et E + dE, si dN est le nombre de places disponibles, on pourra trouver, dans l'état le plus probable, dn = f(E) dN électrons, f(E) étant une fonction dite fonction de Fermi. La dernière bande occupée dont le niveau est le plus élevé porte le nom de bande normale. Elle est séparée de la bande de conductibilité appelée ainsi car les électrons peuvent s'y déplacer librement par une bande interdite où la probabilité de présence électronique est nulle.

Bande de conductibilité

Bande interdite

Bande normale

Une émulsion photographique est constituée d'une suspension d'halogénures d'argent dans de la gélatine. Il s'agit essentiellement de bromure d'argent avec en moindre quantité des cristaux d'iodure et de chlorure d'argent. Ces cristaux présentent certaines irrégularités.

Des images latentes sont produites par l'action des particules α et β sur les cristaux de bromure d'argent de l'émulsion d'une façon semblable à l'absorption de lumière. En traversant l'émulsion les particules provoquent des ionisations ou plus exactement, des électrons passent de la bande normale dans la bande de conductibilité. Les électrons sont piégés alors aux irrégularités spécifiques du cristal, sulfite d'argent ou argent métallique colloïdal qui devient chargé négativement. Des ions d'argent migrent en ces points et neutralisent les électrons. A la fin du processus, des points d'atomes d'argent neutralisés sont formés préférentiellement à la limite du cristal et de la gélatine. Cette disposition de l'argent métallique appelé encore argent photolytique forme l'image latente. Si le nombre d'atomes d'argent dans le cristal est adéquat, le cristal est bon à être développé. Les agents réducteurs du révélateur réduisent les grains de l'image latente en argent métallique. Cette révélation se fait lentement et s'avère plus rapide si préexiste de l'argent métallique. Les grains de l'image latente sont alors plus rapidement transformés en argent que les grains non atteints par les particules.

En limitant le temps d'action du révélateur on pourra réduire les seuls grains atteints par les particules. Le fixateur dissous le bromure d'argent non réduit en formant des complexes solubles sans affecter l'argent métallique qui représente le grain photographique.

III. — EMULSIONS AUTORADIOGRAPHIQUES

A) Caractéristiques.

Des films pour rayons X furent tout d'abord utilisés en autoradiographie pour une localisation grossière des isotopes dans les tissus. En général, la sensibilité des émulsions photographiques augmente au fur et à mesure que s'accroît la taille des cristaux de bromure d'argent. Par ailleurs des émulsions de grains fins sont nécessaires en autoradiographie au niveau cellulaire puisque le pouvoir de résolution dépend de la taille des grains. Pour cette raison les émulsions photographiques destinées à l'autoradiographie sont relativement insensibles. Les émulsions qui ont été préparées pour les usages autoradiographiques

ont un diamètre moyen des grains situés autour de 0,2 μ et moins. Afin d'augmenter leur sensibilité les émulsions autoradiographiques ont une haute concentration en bromure d'argent, 86 % de leur poids est constitué d'Ag Br, ce qui correspond à environ la moitié du volume de l'émulsion. La sensibilité est alors suffisante pour enregistrer les électrons au minimum de leur pouvoir d'ionisation spécifique à 1 MeV environ.

Les émulsions les plus communément utilisées sont des émulsions de recherche nucléaire du type NTB, NTB 2 et NTB 3 de Kodak (U.S.A.), les émulsions de recherche nucléaire G 5 K 2 K 5 et L 4 de Ilford Londres, Scientia N U C 307 et 715 de Gevaert Belgique et les plaques « stripping » de Kodak autoradiographie Londres.

Les plaques « stripping » ont l'avantage d'avoir une épaisseur d'émulsion toujours constante, ce qui est particulièrement important dans le cas de l'autoradiographie quantitative.

B) La réponse autoradiographique de l'émulsion.

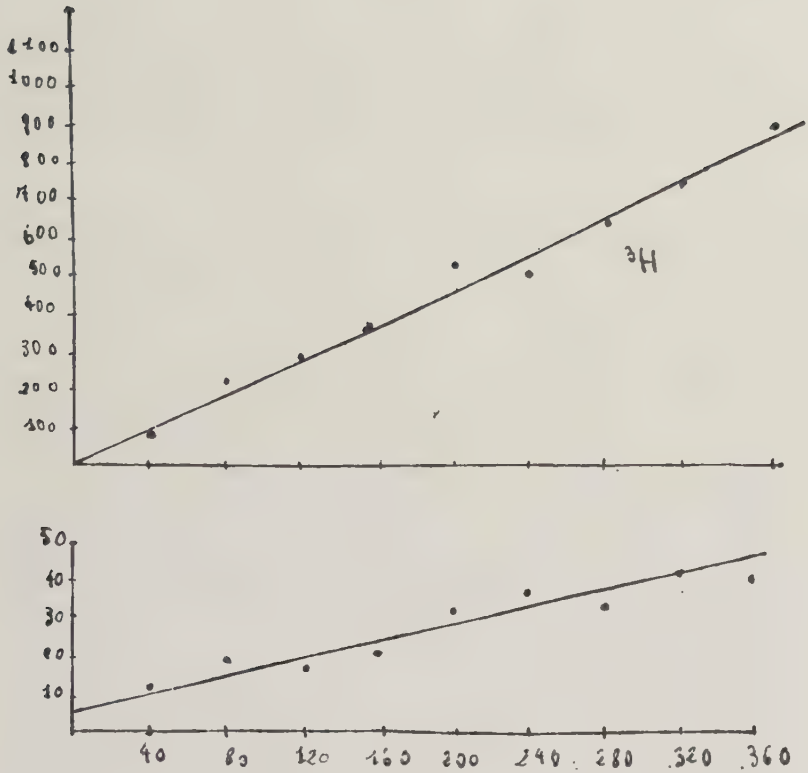
Il y a une différence fondamentale entre la réponse d'une émulsion photographique à la lumière et sa réponse aux particules. Dans le cas de la lumière comme source de rayonnement, il y a une réponse retardée devant une période d'induction ; tout se passe comme si l'émulsion pendant cette période restait inerte au rayonnement. Puis la densité en grains augmente linéairement avec l'exposition et avec de hautes densités optiques la courbe de proportionnalité présente alors un plateau de saturation.

Dans le cas des rayons α, β *et* γ on n'observe pas cette inertie de l'émulsion ; la densité en grains s'accroît linéairement avec le temps d'exposition tout comme dans le cas des rayons X dans les zones de basse densité optique. Mais si l'émulsion est surexposée, la densité en grains tend vers une saturation, comme pour l'émulsion photographique.

C) L'effet d'évanouissement ou « fading effect ».

Le phénomène du fading consiste en un évanouissement, un effacement de l'image latente qui produit une perte de constraste de l'autoradiogramme car les grains impressionnés cessent d'être développables.

Hertz (1951) rapporte un fading de 30 % et Ray et Stevens (1953) de 80 % en une semaine pour une plaque « stripping ». Le taux de fading dépend de l'émulsion, de la puissance d'ionisation des particules incidentes et spécialement de l'humi-



Influence du temps d'exposition sur la réaction et le voile de fond d'autoradiogrammes
En abcisse le temps d'exposition (en jours)
En ordonnée le nombre de grains par 2000 μ^2

dité et de la présence d'oxygène durant l'exposition. Albouy et Faraggi trouvèrent que le fading est dû à une oxydation de l'image latente par l'oxygène de l'air tandis que l'humidité facilite la pénétration de l'oxygène à travers la gélatine. C'est pour cela, qu'ils proposèrent l'exposition dans un gaz chimiquement inerte et sec. La courbe du taux de fading de l'image latente est une fonction de l'humidité relative, plus précisément une fonction exponentielle du taux d'humidité de l'émulsion. L'observation selon laquelle la sensibilité de l'émulsion est diminuée à

des humidités relatives élevées peut être attribuée à l'augmentation du taux de fading de l'image latente. Messier et Leblond trouvèrent aussi un fading considérable si les autoradiogrammes sont exposés en atmosphère humide. Herz (1959) suggéra l'exposition des autoradiogrammes dans une athmosphère de CO_2.

IV. — LA RESOLUTION AUTORADIOGRAPHIQUE

A) Théorie.

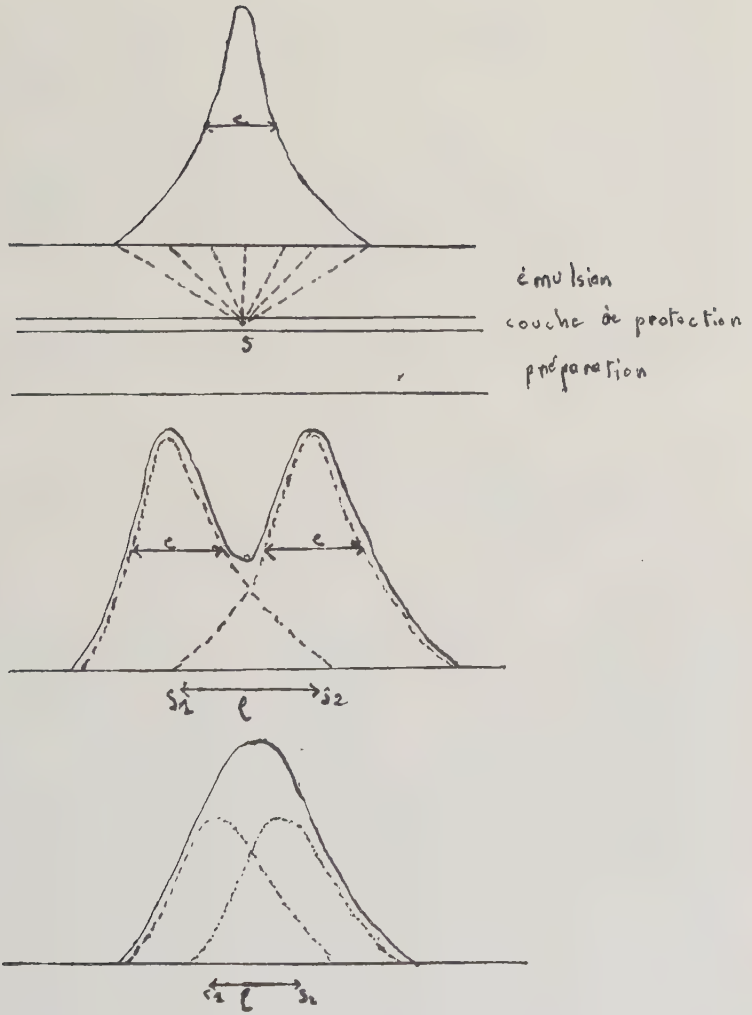
L'image autoradiographique de la source radioactive n'est pas exactement comparable à l'image photographique produite par un système optique. Dans un système optique, une source ponctuelle est transformée en une image virtuellement ponctuelle, tandis qu'une source ponctuelle radioactive dans la préparation produit une plus ou moins large distribution des grains d'argent dans l'émulsion puisque les particules sont émises dans toutes les directions et passent à travers l'émulsion plus ou moins diagonalement. Seule une faible proportion d'entre elles atteignent l'émulsion perpendiculairement. La figure en annexe illustre schématiquement les conditions de la résolution en autoradiographie.

L'échantillon histologique contient une source ponctuelle radioactive qui émet des particules dans toutes les directions en supposant que toutes les particules ont une trajectoire linéaire et une constante densité d'ionisations. L'émulsion est située sur la source et se trouve séparée d'elle par une mince couche de protection. La distribution des grains dans l'émulsion correspond alors aux points sur la figure 3.

La densité en grains est la plus élevée directement au-dessus de la source ponctuelle et diminue rapidement avec l'accroissement de la distance à la source. La courbe de la figure 3 A représente la densité en grains. La dispersion de la courbe au point où l'intensité est la moitié de l'intensité maximale est une mesure de la résolution.

Plus la distance (b) est petite, plus étroite est l'image autoradiographique et meilleure la résolution. La meilleure résolution est obtenue quand la source radioactive est la plus proche possible de l'émulsion.

La plus courte distance entre deux sources ponctuelles par laquelle elles peuvent être reconnues comme deux points distincts constitue le « pouvoir de résolution ». Deux sources ponctuelles radioactives dans la coupe histologique, comme la figure 3



Théorie du pouvoir de résolution en autoradiographie

S source de rayonnement radioactif

ℓ distance entre 2 sources ponctuelles

e largeur de distribution des grains au demi-maximum

le montre ne peuvent être distinguées comme deux sources distinctes que si la distance entre elles est supérieure à la largeur de la courbe au point de demi maximum. La courbe pleine de la figure 3 B représente la courbe somme des densités en grains des deux sources et montre deux maximum distinctement séparés. Si la distance entre ces deux sources est inférieure à la largeur de la courbe à la moitié de la densité maximale, la courbe somme montrera seulement un maximum distinctement séparés. Si la distance entre ces deux sources est inférieure à la largeur de la courbe à la moitié de la densité maximale, la courbe somme montrera seulement un maximum.

B) Facteurs influençant la résolution autoradiographique.

Le pouvoir de résolution dépend :

a) de facteurs géométriques,
b) de l'énergie des particules,
c) des caractéristiques de l'émulsion,
d) de l'exposition.

1. *Facteurs géométriques.*

L'épaisseur de la préparation, celle de l'émulsion, plus spécialement celle de la couche séparatrice et plus généralement la distance de la source de radiation à l'émulsion influencent profondément le pouvoir de résolution. Plus la distance entre la source de rayonnement et émulsion est courte, plus la distribution des grains est étroite. Des études théoriques et expérimentales démontrent l'importance de ces différents facteurs (Doniach et Pelc (1950), Hermann (1961-1962). En supposant que l'émission β soit distribuée sous forme de trajectoires perpendiculaires à la coupe, l'influence des différentes couches de la source sur la résolution peut être calculée. C'est ainsi que l'épaisseur de la couche de protection entre la coupe et l'émulsion a le plus d'influence sur le pouvoir de résolution. En utilisant du carbone 14, le contact direct entre la coupe et l'émulsion produit une résolution d'environ 2 — 3 μ. Une couche de 3 μ entre coupe et émulsion affaiblit la résolution de 2 - 3 μ à 8,2 μ (Chapmann et Andresen, 1953).

Conformément aux calculs théoriques de Doniach et Pelc (1950), la perte de pouvoir de résolution par une couche interposée de moins de 0,1 μ semble être relativement faible. Dans beaucoup de cas la couche de protection peut être négligée si des plaques témoins montrent qu'elle n'a aucune influence chimique sur l'émulsion.

L'influence de l'épaisseur de la préparation est moins importante car la réduction de celle-ci entraîne une diminution de la quantité de produits radioactifs tout comme une diminution de l'épaisseur de l'émulsion entraîne une diminution de la sensibilité de cette dernière.

Dans une certaine mesure la résolution d'une préparation plus fine peut compenser une diminution de la quantité de radioisotopes Falk et King, 1963). Il peut être noté que les valeurs données dans la littérature pour l'épaisseur de la préparation sont rattachées au réglage du microtome. D'autre part la coupe déparaffinée, telle qu'elle est actuellement utilisée en autoradiographie, est moins épaisse que la coupe paraffinée (l'eau et les lipides sont extraits), or seule l'épaisseur du matériel sec joue un rôle dans la résolution.

2. *Energie du rayonnement* β.

La résolution autoradiographique dépend aussi de l'énergie moyenne des particules β, c'est-à-dire de leur pouvoir pénétrant.

Hermann (1962) détermina théoriquement et expérimentalement la relation entre l'énergie maximale β et le pouvoir de résolution. Les valeurs obtenues par les courbes expérimentales et théoriques aboutissent au même résultat. Le pouvoir de résolution au-dessus d'une énergie de 0,6 MeV dépend étroitement de l'énergie des particules β, tandis qu'entre 0,6 et 0,2 MeV les courbes montrent une valeur limite constante, plus faible du pouvoir de résolution. La plupart des émetteurs β généralement utilisés en autoradiographie ont une énergie moyenne de 0,6 MeV ou moins. Pour les émetteurs auxquels correspond une épaisseur maximale supérieure à l'épaisseur de la coupe et de l'émulsion, la diminution de l'intensité de rayonnement avec la distance à la source dépend d'une loi de carré inverse, l'absorption étant supposée négligeable ; c'est pourquoi dans ce cas la résolution est essentiellement fonction de facteurs géométriques.

Avec des énergies β de moins de 0,2 MeV, l'absorption doit toutefois être prise en considération. Pour des rayonnements β de basse énergie, dont les trajectoires se terminent dans l'émulsion, le pouvoir de résolution augmente quand l'énergie diminue puisque la pénétration des particules β dans l'émulsion est plus faible. Le tritium avec une énergie maximale de 18 keV correspondant à une pénétration de 6-7 μ dans l'eau et à une énergie β moyenne de 5,7 keV a une pénétration effective de 1 μ dans un matériel de densité unité.

Aussi les grains sont-ils situés en une étroite couche de l'émulsion d'environ 1 μ qui regarde la préparation et que seule

une étroite couche de celle-ci regardant l'émulsion contribue à former l'image autoradiographique. A cause de ce haut pouvoir de résolution, cet isotope est très utilisé dans les études autoradiographiques aux niveaux cellulaire et subcellulaire.

3. *Taille des grains de l'émulsion.*

Il est évident que le pouvoir de résolution dépend de la taille des grains de l'émulsion. C'est pourquoi les émulsions les moins sensibles formées de très fins grains produisent-elles la meilleure résolution en autoradiographie. La taille des grains et par conséquent la résolution sont également influencées par les conditions du développement.

4. *L'exposition.*

Si l'exposition est étendue sur de longues périodes, la densité en grains sur la source de rayonnement approchera la saturation, ce qui conduira à un élargissement de la courbe de densité en grains, d'où une diminution de la résolution.

V. — ADMINISTRATION DES ISOTOPES

A) Considerations générales sur les quantités d'isotopes a injecter.

Pour obtenir des images autoradiographiques satisfaisantes au niveau cellulaire avec une bonne résolution, la préparation doit être très mince. Comparée aux échantillons d'études biochimiques, elle contient seulement une faible masse de produit biologique. C'est pourquoi la concentration des isotopes dans les constituants cellulaires doit être relativement élevée en référence aux études aux traceurs biochimiques, où plusieurs de ces constituants cellulaires peuvent être mis en commun.

En principe l'émulsion photographique n'est pas moins sensible que le compteur dans une étude biochimique pour les techniques usuelles car environ $1/10^e$ de toutes les particules β provoquent une impulsion du compteur ou émulsionnent un grain d'argent. En compensation de la faible masse des échantillons radioactifs dans les études autoradiographiques, des temps d'exposition radioactive 100 fois plus longs que dans les travaux biochimiques sont nécessaires. Dans cette voie il est possible d'enregistrer la radioactivité jusque dans les structures subcellulaires.

Le total de la radioactivité trouvée dans les tissus dépend de plusieurs facteurs, comme le comportement biologique du

précurseur, la dilution par des isotopes radioactifs toujours présents dans l'organisme, le temps entre l'administration de la dose et le sacrifice des animaux ou le temps d'incubation en cultures cellulaires et de la préparation du tissu. De plus le dosage dépend de la technique autoradiographique utilisée (noircissement ou trajectoires individuelles) et de la sensibilité de l'émulsion autoradiographique. C'est pourquoi aucune règle générale ne peut être donnée pour le dosage d'un isotope. Le dosage doit être déterminé empiriquement pour obtenir de bonnes images autoradiographiques dans des temps d'exposition convenables. Des calculs fondés sur des expériences analogues avec les traceurs radioactifs peuvent être très utiles.

Les substances marquées qui sont utilisées pour les études autoradiographiques doivent avoir une activité spécifique élevée. D'une part, la quantité administrée ne doit pas excéder les limites physiologiques et d'autre part la concentration isotopique dans le tissu doit être plutôt élevée. Les limites d'un travail autoradiographique sont souvent assignées par la difficulté de préparer des précurseurs d'activité spécifique suffisamment élevée surtout si la période de l'isotope est longue. Or des isotopes de courte période ne sont pas qualifiés pour des recherches autoradiographiques car le temps compris entre la préparation et l'exposition des autoradiogrammes est insuffisant.

B) Effet de la dose de rayonnement.

A cause de la quantité relativement élevée de radioactivité administrée une attention spéciale doit être portée sur un dommage possible par rayonnement. Si la distribution de la substance marquée dans l'organisme et son excrétion sont connues la dose de rayonnement produite pa rles particules α et β peut être estimée. Cela n'est vrai que pour de grandes distributions.

C) Distribution de la microdose.

Pour que la dose de rayonnement ne dépasse pas la dose tolérable au niveau cellulaire, la connaissance de la microdistribution de la dose de rayonnement est nécessaire.

La dose de rayonnement attachée à un certain point du tissu est due à toutes les particules β qui atteignent ce point. Puisque les particules β émises dans l'environnement du point d'émission sont absorbées à une distance plus grande que l'épaisseur maximale de l'isotope, pour obtenir un schéma ou plan de distribution de la microdose de rayonnement β, une préparation de l'épaisseur de la pénétration maximale de l'isotope utilisé

devrait être préparé. La distribution de la densité en grains dans l'autoradiogramme de cette coupe correspond alors à la dose locale de rayonnement et elle représente une image approximative de la distribution de l'isotope dans la coupe. Le rayonnement peut être maintenu assez bas si la méthode des trajectoires individuelles est appliquée car la radioactivité administrée peut être 10 à 100 fois moindre que celle requise pour l'autoradiographie par noircissement.

D) Dose de rayonnement avec le tritium.

Pour des émetteurs β de très basse énergie comme le tritium, il est difficile de calculer la dose de rayonnement exact. Avec des précurseurs spécifiques comme la thymidine marquée au tritium, les particules β sont le plus souvent absorbées à l'intérieur du noyau cellulaire. Si l'on tient compte de la haute ionisation spécifique, la dose de rayonnement absorbée par le noyau cellulaire isolé peut être élevée.

Robertson (1959) a calculé que la dose de rayonnement moyenne par désintégration dans le cas du tritium est diminuée par un facteur de 12 à une distance de 0,5 μ de la source ponctuelle et par un facteur de 60 à 1,0 μ de la source. Toutefois une estimation exacte de la dose de rayonnement dans un noyau isolé tout comme celle du possible dommage par rayonnement est difficile.

VI. — VOILE DE FOND ET ARTEFACTS

A) Facteurs influençant le voile de fond.

Tous les grains de l'émulsion ne sont pas produits par exposition au matériel radioactif. Dans une certaine mesure, ce voile de fond est inévitable puisqu'il est produit durant la préparation de l'émulsion. Des émulsions sensibles ont un voile de fond très développé. Le voile de fond augmente avec l'âge de l'émulsion, un stockage impropre à haute température, l'exposition aux rayons cosmiques, la surexposition en lumière rouge, des influences mécaniques durant les manipulations comme la distorsion et la pression (Moore 1951), des influences chimiques, par exemple des agents réducteurs utilisés durant la préparation de l'échantillon ou contenus dans le tissu et l'exposition des autoradiogrammes à de trop hautes températures. Le voile de fond peut être évité par un stockage approprié à 4° C et une manipulation correcte de l'émulsion. Les effets chimiques peuvent

être évités par une préparation appropriée de l'échantillon et une élimination prudente des agents réducteurs par lavage. Si le tissu lui-même réduit les cristaux de bromure d'argent de l'émulsion, comme un tissu non fixé le peut (Boyd et Board 1949), une couche de protection de celloïdine, de silicone ou de nylon peut être de grand service.

Toutefois si le tritium est utilisé pour le marquage, une couche de celloïdine de 1 μ interposée entre la coupe et l'émulsion absorbera un nombre élevé de particules β. La capacité réductrice du tissu fut principalement attribuée aux groupements SH. Toutefois Everett et Simmons purent montrer qu'un effet réducteur apparaissait même après saturation ou blocage des radicaux SH. Ils trouvèrent aussi qu'une couche de celloïdine interposée ne pouvait pas prévenir l'effet réducteur sur l'émulsion. En accord avec ces résultats les agents réducteurs devraient être hydrosolubles parce qu'un lavage excessif de ces préparations déplacent ces substances. Le voile de fond provoqué par des effets chimiques de l'échantillon pourrait toujours être évalué par comparaison avec des préparations non radioactives de la même espèce.

B) Détermination du voile fond.

En autoradiographie quantitative le voile de fond pourrait être déterminé près de l'endroit où le comptage est effectué et pourrait être soustrait du nombre total de grains. Il est incorrect de déterminer ce voile à l'extérieur de l'échantillon sur la zone marginale de l'autoradiogramme seulement, puisque le voile de fond de l'émulsion qui ne couvre pas le tissu peut être différent de celui qui couvre le tissu sans être en regard d'une source radioactive.

Si par exemple, avec de la thymidine radioactive, seuls quelques noyaux cellulaires sont marqués, le voile de fond devrait être compté sur les noyaux non marqués.

C) Artefacts.

A côté de l'effet mentionné du tissu non radioactif sur le film, plusieurs artefacts peuvent apparaître durant la manipulation. Dans la plupart des cas ces artefacts peuvent facilement être distingués de l'effet de l'isotope sur l'arrière plan. Un éclaircissement par électricité statique, qui apparaît par manipulation du film « stripping » en atmosphère sèche, peut se produire. Une distortion du film sur les bords du tissu conduit à des grains développables et provoquera de mauvaises interprétations. Des

grappes de grains qui apparaissent dans des émulsions très diluées sont aisément reconnaissables et à l'opposé de ces effets qui produisent des grains, des agents oxydants dans le tissu conduisent à l'extinction de l'image latente.

D'autres artefacts peuvent apparaître durant le développement et la fixation. Le relâchement du film ou son déplacement peuvent simuler un effet radioactif à des endroits où il n'y a pas de matériel radioactif. Sur le film « stripping » ou l'émulsion sont généralement séchés à l'air ou dans un courant d'air froid un voile de fond plus accusé peut apparaître.

La coloration de l'échantillon après processus photographique peut conduire à des artefacts par dissolution des grains d'argent.

VII. — AUTORADIOGRAPHIE QUANTITATIVE

A) Problème.

Il est théoriquement possible d'utiliser la méthode autoradiographique comme outil quantitatif pour mesurer la radioactivité par micron cube au niveau des structures subcellulaires comme cela se fait en biochimie au niveau d'organes ou de tissus. Dans le cas de l'autoradiographie l'émulsion remplace le compteur. Toutefois en autoradiographie quantitative appliquée il y a deux problèmes :

— la réponse quantitative de l'émulsion c'est-à-dire l'étalonnage absolu de l'émulsion (Cf. VII C) ;

— l'influence de l'autoabsorption ou self-absorption β de l'échantillon sur la réponse autoradiographique. Les facteurs de self-absorption sont sans importance quand on utilise des émetteurs de haute énergie β. Au contraire ils le sont énormément dans le cas de l'autoradiographie au tritium.

B) Analyse quantitative des autoradiogrammes.

Il y a trois méthodes décrites pour l'analyse quantitative des autoradiogrammes :

a) Détermination de la densité en grains en comptant les grains isolés ;

b) Comptage des traces ;

c) Détermination photométrique de la densité optique.

1. *Comptage des grains.*

Le comptage visuel des grains isolés avec un oculaire à

grille de microns carrés prend du temps mais constitue une méthode simple, utile et très sensible. Avec un objectif à immersion, les grains isolés sont clairement visibles. Dans le cas du tritium les grains sont enfermés dans une couche d'environ 1 μ ou moins et sont aisément comptés. Des électrons d'énergie plus élevée produisent des grains dans différentes couches d'émulsion et ils peuvent être comptés par déplacement de haut en bas d'un objectif à immersion d'huile. Nadler a décrit une méthode pour compter les grains qui ne prend en considération que les grains des couches spécifiques dans une surface donnée centrée sur la source.

L'influence du facteur d'absorption et le cœfficient de self absorption ne concerne que les isotopes de très basse énergie.

Ce comptage visuel est fastidieux, aussi différents appareils de comptage électrique des grains ont été mis au point.

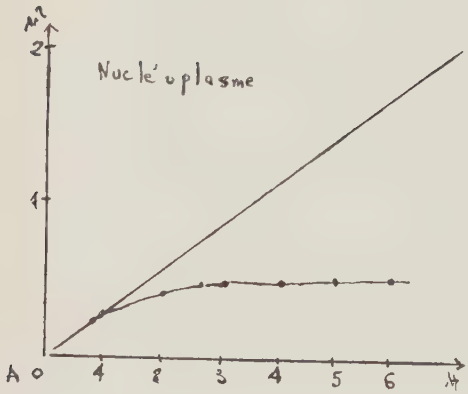
2. *Comptage des traces.*

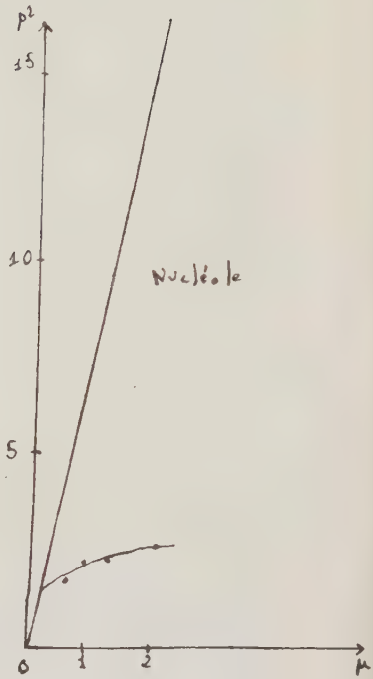
L'intérêt de l'autoradiographie par trajectoires individuelles nécessitant d'assez petites quantités de produits radioactifs a toujours été mentionné. Le comptage des trajectoires α est simple parce qu'il s'agit de grains étroitement espacés et parce qu'il s'agit de grains étroitement espacés et parce que les particules α ont une faible pénétration. Elles sont facilement comptées dans une émulsion d'épaisseur supérieure à la longueur de pénétration des particules. On peut estimer le nombre total des trajectoires en comptant leur nombre par unité de surface et en ramenant ce nombre à la surface totale. En réalité le calcul se complique du fait que les émetteurs peuvent se désintégrer en éléments radioactifs fils qui émettent aussi des particules α.

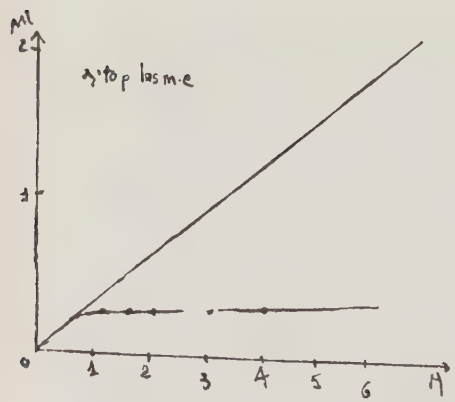
Il est plus difficile de compter des trajectoires β à cause de leur faible ionisation spécifique initiale ; il est difficile quelquefois impossible, de déterminer l'origine de ces trajectoires. Des électrons β de haute énergie produisent des grains qui sont très éloignés de l'origine de leur trajectoire. Des électrons β de basse énergie produisent un nombre plus élevé de grains par unité de longueur plus proches de leur origine, mais les trajectoires sont plus tortueuses.

3. *Détermination photométrique de la densité optique.*

Avec cette méthode la densité optique de l'émulsion est mesurée par un microphotomètre. L'image aggrandie est localisée par appareil microphotographique au niveau de l'unité de recherche du densitomètre. La densité mesurée peut être rapportée au contenu en isotope dans le tissu par comparaison aux







Courbes de densité en grains sur ien nucléoplasme, le cytoplasme et le nucléole en fonction de l'épaisseur de la préparation marquée au tritium.

En ordonnée, le nombre de grains [par μ^2], en abcisse l'épaisseur de la coupe (en μ)

Les droites schématisent les courbes théoriques de densité en grains sans self-absorption.

densités optiques, cette méthode se heurte à de nombreuses difficultés pratiques si bien que la méthode de comptage des grains lui est préférable.

C) Nombre de grains produits par processus de désintégration.

L'objet de l'autoradiographie quantitative consiste en une détermination absolue de la radioactivité dans les différentes structures cellulaires. La corrélation entre le nombre de grains développés dans l'émulsion et la concentration d'atomes d'isotopes dans l'échantillon sous-jacent peut être estimée si l'efficience de l'isotope pour l'émulsion utilisée est connue. Le nombre de grains produits par processus de désintégrations a été mesuré pour différents isotopes et des émulsions variées. On peut trouver ces tableaux dans la littérature scientifique. Si l'efficience est connue dans un cas particulier, le contenu en isotope de l'échantillon peut être calculé. Par ailleurs la densité en grains peut être comparée avec des autoradiogrammes d'une source à radioactivité connue.

D) Autoradiographie quantitative au tritium.

A cause de son haut pouvoir de résolution le tritium occupe une place de choix dans l'autoradiographie quantitative aux niveaux cellulaires et subcellulaires.

Toutefois à cause de la basse énergie des électrons β du tritium, la self-absorption β et l'absorption β influencent profondément les données quantitatives.

La self-absorption β ou autoabsorption β est l'absorption des particules β par les éléments cellulaires dans lesquels le matériel radioactif est placé tandis que l'absorption β à proprement parler désigne l'absorption de ces mêmes particules par la couche de protection placée entre la coupe et l'émulsion.

Ainsi nous étudierons successivement l'importance de ces deux phénomènes.

a) *Influence de la self-absorption* β.

Maurer et Primbsch (1964) ont étudié l'influence de la self-absorption β du tritium dans les différentes structures cellulaires. Pour cela les densités moyennes en grains furent comptées dans les différentes structures cellulaires sur des autoradiogrammes de coupes d'épaisseurs variées de 0,3 μ à 6,0 μ (inclus dans du méthacrylate qui était déplacé après comptage). A cet effet on compta les grains dans le cytoplasme et le nucléoplasme après

densité en grains

densité théorique

densité réelle

0

0,1

0,2

A masse sèche de la préparation (mg/cm²)

100

50

courbe d'absorption

B

0,1

0,2

épaisseur du matériel absorbant (mg/cm²)

1

0,5

0

0,1

0,2

nucléoplasme

cytoplasme

nucléole

marquage avec des amino acides porteurs de tritium et ceux du nucléole après marquage avec de la cytidine tritiée. Les courbes A-C de la figure 4 montrent les résultats. Pour ces trois structures cellulaires, les courbes augmentent linéairement à de très petites épaisseurs et montrent ensuite un plateau de saturation. La courbe du nucléole commence à s'aplatir à quelques dixièmes de microns.

Pour la même épaisseur la self-absorption β est plus faible pour le cytoplasme et encore moins pour le nucléoplasme. Aussi, des corrections ont été faites pour les différentes capacités de self-absorption β dans les différentes structures. Il n'y a que pour une coupe d'épaisseur aux environs de 0,1 μ que la densité en grains sur les trois composants cellulaires représente le contenu réel d'activité tritiée des différentes structures cellulaires.

Tandis que les courbes de la figure 4 sont rapportées seulement à un tissu particulier (foie de Souris), les courbes de la fiugure 5 sont d'importance générale. La figure 5 montre que les courbes de densité en grains pour les trois différents constituants cellulaires se résolvent en une même courbe si l'épaisseur de la préparation en microns est remplacée par les masses sèches en milligrammes par centimètre carré et si les coordonnées des courbes sont corrigées. Cela était à prévoir puisque la self-absorption dépend seulement de la masse absorbante (mg/cm^2) au moins dans le domaine des nombres atomiques peu élevés. La figure 5 C donne le cœfficient d'autoabsorption qui montre à quelle fraction la densité en grains se ramène du fait de la self-absorption β (mg/cm^2). Comme le montre la figure 5 C, le cœfficient de self-absorption est très différent pour les différentes structures cellulaires. Par exemple, pour une coupe de foie de 1 μ, le cœfficient de self-absorption est de 0,2 pour le nucléole, 0,6 pour le cytoplasme et 0,8 pour le nucléoplasme c'est-à-dire que sur le nucléole on trouve seulement 20 %, sur le cytoplasme 60 % et sur le nucléoplasme % des grains qui seraient produits sans self-abpsorption. Si l'on ne tient pas compte de ces différences, le nombre de grains ne peut pas être considéré comme une mesure de l'activité incorporée dans les différents compartiments cellulaires. Les données numériques prouvent que la self-absorption β a une influence importante sur le comptage des grains dans l'autoradiographie au tritium. C'est pourquoi dans une analyse quantitative des autoradiogrammes au tritium, la densité des matériaux (masse sèche en mg/cm^2), doit être connue et que de là, le cœfficient de self-absorption peut être déduit de la courbe de la figure 5 C.

b) Influence de la β absorption.

La courbe de β absorption de la figure 5 B fut déduite de la courbe 5 A. Elle représente l'influence de l'absorption sur le rayonnement β tritié au cas où une couche d'absorption inactive couvre la source de rayonnement. En accord avec les données de cette courbe d'absorption, on constate que la densité en grains est diminuée de 10 % de sa valeur réelle par une couche d'absorption de 0,05mg/cm^2 seulement.

TECHNIQUES AUTORADIOGRAPHIQUES

I. — PREPARATION DU TISSU

A) Fixation du tissu pour l'autoradiographie.

1. *Influence du fixateur sur le contenu de radioactivité.*

Dans la préparation d'échantillons pour autoradiographie la fixation est la première phase des techniques habituelles. Le choix du fixateur dépend du composé marqué utilisé et du but poursuivi. Si la distribution des substances hydrosolubles est recherchée la plupart des substances radioactives seront alors perdues durant les processus de fixation usuelle et une technique spéciale doit être employée. Par ailleurs si des études métaboliques de protéines, d'acides nucléiques et de polysaccharides sont exécutées, la possibilité de fixer des substances de haut poids moléculaire en dissolvant des précurseurs marqués hydrosolubles ou des métabolites présente un grand intérêt. Dans ces études des fixateurs chimiques communs comme le formol (pur ou avec de l'alcool et de l'acide acétique), le Carnoy, le Bouin, sont utilisés pour rendre insolubles les protéines, les acides nucléiques, pour toutes les solutions appliquées par la suite. Des précautions doivent être prises pour que les fixateurs n'affectent pas l'émulsion photographique. Certains fixateurs ayant une action réductrice ou oxydante (les fixateurs aux sels métalliques) doivent être prudemment déplacés avant l'application du film. Du tissu non fixé peut contenir également de telles substances.

Des agents réducteurs provoquent du brouillard sur le film, des agents oxydants peuvent provoquer du fading sur les images latentes. Le fixateur de Zenker par exemple est réputé désensibiliser l'émulsion photographique. Les fixateurs mentionnés ci-dessous n'affectent généralement pas le film, mais il est toujours judicieux de tester l'influence du fixateur par des coupes témoins.

Effet de la fixation sur l'intensité de la réaction autoradiographique

	Cytidine tritiée injectée dans le foie de Souris (*grains* 1.000 μ)
Carnoy	124,4 ± 3,8
Bouin	116,6 ± 5,1
Formol	105,5 ± 1,9
Zenker	3,1 ± 0,2
Zenker (iode et cysteine)	75,1 ± 2,1

2. *Fixation différentielle.*

La fixation des protéines par des fixateurs contenant des substances précipitant les protéines présente l'intérêt de précipiter quantitativement les protéines et d'éliminer le précuseur, l'acide aminé libre. Droz et Warskowsky (1963) utilisant de la leucine 14 C rapportent que 91 à 97 % de la radioactivité est retenue dans les coupes histologiques après application d'acides aminés marqués. Elle serait retenue aux protéines vraisemblablement par des liaisons peptidiques.

En vue d'éliminer les acides aminés marqués libres du tissu aussi complètement que possible, il est judicieux d'ajouter l'acide aminé correspondant non radioactif en excès au fixateur et à toutes les solutions utilisées par la suite. Par cette voie, l'activité spécifique de l'acide aminé libre peut être diminuée et d'autre part des molécules marquées absorbées par des constituants cellulaires peuvent être échangés avec des acides aminés non marqués qui ne sont pas efficients en autoradiographie.

B) Extraction différentielle des tissus.

1. *Acides nucléiques.*

La démonstration de l'incorporation d'un précurseur marqué dans un composé particulier peut être obtenue si l'extraction biochimique ou enzymatique dans la coupe histologique conduit à l'élimination de l'effet autoradiographique en référence aux coupes de contrôle.

a) Extraction à la ribonucléase :

En accord avec les résultats obtenus en biochimie, la ribonucléase dépolymérise spécifiquement l'acide ribonucléique. Pour le traitement à la ribonucléase, les coupes histologiques sont généralement immergées dans une solution à 1 mg de ribonucléase par millilitre d'eau distillée pendant 4 heures à 40°.

L'efficacité de la ribonucléase dépend toutefois du fixateur utilisé. Le fixateur de Carnoy serait satisfaisant, mais le Zenker inactiverait la ribonucléase.

b) Extraction à la désoxyribonucléase :

Dans ce cas il est opportum d'immerger les coupes pendant 24 heures à 37° dans une solution contenant 0,05 mg de désoxyribonucléase cristallisée par millilitre de tampon de Gomori avec 0,2 M Mg S 04 7 H2 0 pH 5,7). Le Carnoy conviendrait encore, mais le Zenker inactiverait la désoxyribonucléase.

c) Extraction par hydrolyse acide :

Une extraction de 15 — 30 mn à 90° C à l'acide trichloracitique ou à l'acide perchlorique déplace les deux acides R N A et D N A de la plupart des types cellulaires vraisemblablement sans inactiver les protéines.

2. *Protéines.*

Il est très difficile de séparer différentes espèces de protéines par des méthodes d'extraction spéciales comme celles décrites pour les acides nucléiques.

Les histones peuvent être extraites des coupes de tissu fixé sans qu'il y ait déplacement des autres protéines, mais aucune des méthodes utilisables ne peut séparer les protéines avec plus de précision qu'en types histonique et non histonique. Pour l'extraction des histones, les acides nucléiques doivent être d'abord déplacés par traitement à l'acide trichloracétique chaud. Ces réactifs ne doivent pas déplacer les histones des préparations de tissu fixé. Il est alors possible d'utiliser de l'acide chlorhydrique ou de la pepsine.

3. *Sulfomucopolysaccharides.*

L'extraction des différents types de sulfomucopolysaccharides par traitement à la hyaluronidase fut étudiée par Bélanger (1954). La chondroïtine sulfate A, qui est le plus souvent trouvée dans le cartilage hyalin est hydrolysée par les hyaluronidases testiculaires et pneumococcique tandis que la chondroïtine sulfate B résiste aux deux types de hyaluronidase. La chondroïtine sulface C par ailleurs n'est hydrolysée que par la hyaluronidase testiculaire. Ces différences offrent des possibilités pour la démonstration différentielle des différents sulfomocopolysaccharides.

C) Préparation de frottis.

Il est préférable en hématologie et dans les cultures tissulaires de préparer des frottis sanguins, de moelle osseuse, de li-

quide lymphatique ou de cellules cultivées. Dans la plupart des cas ces frottis sont fixés au méthanol.

D) Préparation de coupes d'os non décalcifiés.

La préparation autodiographique ne diffère que peu de la préparation histologique classique. On l'utilise dans le cas où la décalcification conduirait à la perte ou au déplacement complet de l'isotope. Axelrod propose une fixation dans l'alcool (1947) et une inclusion dans la paraffine.

E) Epaisseur des coupes.

Des coupes de 3 μ à 5 μ sont utilisées habituellement. Plus la coupe est fine, meilleure est la résolution ainsi que le rattachement des grains à la structure cellulaire correspondante.

Un facteur limitant de la diminution de l'épaisseur de la coupe est la réduction de l'activité qui décroît linéairement avec celle-ci.

II. — TECHNIQUE D'APPLICATION DES EMULSIONS PHOTOGRAPHIQUES

On distingue essentiellement deux procédés en ambiance de lumière rouge :

— la technique d'apposition ; la coupe est placée sur une plaque et pressée contre la surface d'émulsion. Après exposition, elles sont séparées. La coupe est colorée et l'émulsion développée. A cause du contact relativement lâche, cette méthode n'est utilisée que lorsqu'une localisation approximative des composés radioactifs est recherchée ;

— la technique de montage ; la coupe histologique est montée directement sur l'émulsion photographique durant le processus photographique et la coloration du tissu. Une variante de cette technique est la technique sandwich dans laquelle l'émulsion et la préparation sont couvertes par une autre émulsion.

A) Technique du film « stripping ».

Cette technique introduite par Pelc utilise une fine émulsion photographique avec une base de gélatine perméable qui doit être détachée d'une plaque de verre ou de celluloïde. Avant l'application du film « stripping », les lames sont plongées rapi-

dement dans une gélatine très diluée additionnée d'alun chromique (0,5 % de gélatine et 0,05 % d'alun chromique dissout dans de l'eau distillée).

A l'état sec la couche de gélatine a une épaisseur d'approximativement 1/1.000 μ à 1/100 μ et, ainsi, ne doit pas influencer la faible pénétration des rayons β du tritium. Cette fine couche de gélatine placée sur les deux côtés de la plaque prévient la perte du film. Les lames peuvent être suivies à travers toutes les procédures photographiques du développement, de la fixation et de la coloration sans dislocation du film pourvu que celui-ci puisse sécher complètement entre les phases de photographie et de coloration. Kodak fournit un film « stripping » avec une couche de 5 μ d'émulsion de grains fins (diamètre des grains d'approximativement 0,2 μ) et une base de gélatine de 10 μ. L'émulsion est retenue à une plaque de verre. Des pièces suffisamment grandes du film sont coupées, détachées de la plaque de verre et mis à flotter avec l'émulsion à la surface d'un bain d'eau distillée à 20° C. Après 2-3 mn le film est étalé. Il est placé sur la lame, en le ramassant avec celle-ci qui est immergée et mis en contact étroit avec elle. Le film s'étend lui-même sur la lame lorsque celle-ci est retirée de l'eau. Il est conseillé de travailler en atmosphère humide pour éviter l'apparition d'électricité statique.

B) Technique de l'émulsion liquide.

En vue d'améliorer le contact entre la préparation et l'émulsion photographique Bélanger et Leblond (1946) utilisèrent une émulsion liquide placée sur la lame avec la coupe histologique et étendue avec une baguette de verre.

1. *Couche d'émulsion mince.*

Le liquide d'émulsion est fondu dans un bain marie à 40° C. La dilution ou la non dilution sont fonction du type de l'émulsion et de la recherche effectuée. Une émulsion diluée donne des couches plus fines qu'une non diluée. Une émulsion de plus de deux parties d'eau distillée pour une partie d'émulsion peut conduire à des artefacts. Les lames préchauffées et humidifiées sont plongées dans l'émulsion, retirées après quelques secondes, séchées sur du papier Joseph puis séchées verticalement dans un courant d'air propre. Les bulles d'air doivent être déplacées avec une baguette de verre.

2. *Couche d'émulsion épaisse.*

L'émulsion liquide est également utilisée pour autoradio-

graphie par trajectoires individuelles. L'émulsion est appliquée non diluée ou diluée avec 1/3 d'eau distillée et 2/3 d'émulsion en laissant tomber plusieurs gouttes sur la plaque et en l'étendant avec une brosse et une baguette de verre. Les temps requis pour sécher, développer et fixer sont considérablement plus longs pour les émulsions fines.

C) Technique du double marquage.

La méthode du double marquage introduite récemment est du plus grand intérêt pour certaines études. Elle permet au chercheur d'étudier les dynamiques de processus métaboliques spéciaux en appliquant la même substance mais différemment marquée à différents temps d'intervalles. Par exemple la longueur de la période de synthèse de l'A.D.N. dans une cellule peut être mesurée par application de thymidine marquée au tritium d'abord puis par thymidine marquée au 14 C ensuite après un certain temps d'intervalle. Il est également possible avec cette technique d'étudier simultanément le comportement métabolique de différentes substances.

1. *Couche d'émulsion épaisse.*

La technique du double marquage peut utiliser des couches d'émulsion épaisses. En appliquant des isotopes de différentes énergies, comme c'est par exemple le cas avec des substances simultanément marquées au 3 H et au 14 C, il est possible de distinguer deux marquages dans une émulsion épaisse. Un marquage au tritium par exemple avec une faible énergie des particules β produit des grains dans une très fine couche de l'émulsion tandis qu'un marquage au 14 C avec une énergie 10 fois supérieure produit des trajectoires dans l'émulsion épaisse.

2. *Double couche d'émulsion.*

La technique du double marquage a conduit à des modifications ultérieures de la technique du film « stripping » et de la technique de l'émulsion liquide en vue d'enregistrer des grains de tritium dans la première couche et par exemple des trajectoires à partir du 14 C dans la seconde. Si deux couches d'émulsion sont appliquées en vue d'obtenir une plus grande distinction entre les grains du tritium et les traces des particules β de très haute énergie, elles peuvent consister en la combinaison d'un film « stripping » et d'une émulsion liquide ou dans l'application de deux couches de film stripping ou de deux couches d'émulsion liquide.

Dans tous les cas la première couche est développée après

un temps d'exposition relativement court avant l'application de la seconde couche. La première couche devrait avoir une épaisseur telle qu'après le processus photographique les particules β de faible énergie n'atteignent pas la seconde couche d'émulsion (0,5 mg/cm^2) épaisseur de saturation des rayonnement β provenant du tritium). Selon l'épaisseur de la seconde couche des grains ou des traits sont enregistrés. Avec cette technique même après un long temps d'exposition de la seconde couche d'émulsion, il n'y a pas de production de grains supplémentaires dans la première couche si bien qu'une évaluation quantitative par comptage des grains du marqueur tritié dans la première émulsion est pratiquement possible sans interférence avec les traces de la substance marquée au 14 C. 'Un inconvénient de cette méthode réside dans la moins bonne résolution du marquage au 14 C dans la seconde émulsion. La distance entre l'échantillon et la réaction autoradiographique de la seconde émulsion est souvent trop grande pour permettre une détermination exacte de la source de rayonnement dans l'échantillon.

III. — EXPOSITION

Le temps d'exposition qui dépend du type d'isotope, de la dose injectée, du temps entre l'application et le sacrifice et du type d'émulsion utilisée, doit être déterminée empiriquement par des coupes témoins. En vue d'obtenir une réaction autoradiographique susceptible de permettre au chercheur d'observer des détails microscopiques environ 10^7 à 10^8 particules β devraient frapper 1 cm^2 de l'émulsion. Certaines estimations du temps d'exposition nécessaire peuvent être obtenues en mesurant l'activité de la coupe avec un compteur adapté et en calculant le nombre des particules β par cm^2.

On peut tester les autoradiogrammes en couvrant une série de coupes avec des émulsions et en les exposant. En développant les autoradiogrammes à différents temps d'intervalles, le temps d'exposition correct peut être déterminé.

En général le temps d'exposition ne doit pas dépasser la période de l'isotope utilisé puisque la moitié de l'activité a disparu à ce moment-là et qu'une exposition supplémentaire n'ajoute rien à l'effet autoradiographique.

IV. — DEVELOPPEMENT ET FIXATION

Pour la plupart des émulsions fines utilisables en autoradiographie et des films stripping, un temps de 4 à 6 mn de développement en Kodak D 19 est convenable.

Pour des émulsions épaisses des temps de 20-30 mn sont nécessaires, et sont fonction de la température. Dans certains cas il peut être nécessaire de tremper l'émulsion épaisse de l'eau distillée avant le développement pour la rendre perméable au fixateur.

Le développement le plus communément appliqué devrait être pratiqué à température constante dans des bains d'eau à température réglée. Les stripping films et les émulsions fines sont généralement développées à 18° C ; pour des émulsions épaisses des températures plus basses (12-14° C) sont préférables. Des conditions de développement constantes sont absolument nécessaires en autoradiographie quantitative. Après développement les autoradiogrammes sont rincés dans l'eau (un bain d'arrêt n'est pas nécessaire) et fixés dans un fixateur acide pendant 3 à 10 mn, les émulsions épaisses pendant 20-40 mn. L'hypo est déplacé très lentement par lavage à l'eau courante pendant 15 mn pour les émulsions fines, 30-60 mn pour les émulsions épaisses. Pour un montage immédiat, les coupes sont déshydratées dans l'alcool, nettoyées et montées de façon habituelle. Si les échantillons sont colorés à travers l'émulsion il faut que les radiogrammes soient séchés complètement en vue de prévenir la perte ou la dislocation de l'émulsion durant la phase de coloration.

V. — COLORATION

A) Coloration avant l'application de l'émulsion.

Si les échantillons sont colorés avant l'application de l'émulsion, ils seront légèrement surcolorés, puisqu'il y a une certaine perte des substances hydrosolubles durant le processus photographique. Des précautions devront être prises pour que la coloration ne dissolve pas la substance radioactive en étude. L'hydrolyse durant la coloration de Feulgen peut conduire, par exemple, à une perte de D.N.A. Pour une étude quantitative des autoradiogrammes les coupes de tissu devraient être colorées après le processus photographique, parce que des substances marquées peuvent être dissoutes durant la phase de colora-

tion. Toutefois la coloration de Feulgen doit être exécutée avant la phase photographique parce que l'hydrolyse acide qui est nécessaire affecte l'émulsion.

B) Coloration a travers l'émulsion.

La coloration à travers l'émulsion exige un temps de coloration plus long, et il est judicieux de différencier après coloration avec un mélange d'acide chlorhydrique-alcool en vue de déplacer le colorant de la couche de gélatine. Baserga et Banks (1962) recommandent la digestion de la couche de gélatine par la trypsine. La plupart des colorants histologiques classiques peuvent être utilisés à travers le film (hémalun, hématoxyline et éosine, hématoxyline de Mayer, fuchsine basique, bleu de méthylène, bleu azur, crésyl violet et Giemsa). Des colorations hématologiques ont été également appliquées de façon satisfaisante à travers le film.

VI. — AUTORADIOGRAPHIE DES SUBSTANCES HYDROSOLUBLES

A) Méthode de précipitation.

En vu de prévenir le déplacement des substances hydrosolubles plusieurs méthodes ont été utilisées en autoradiographie. Hempel (1963) étudia l'apparition de cellules porteuses de catécholamines après application de D.O.P.A. tritiée chez les Souris. Pour la fixation de la catécholamine tritiée hydrosoluble, il utilisa la précipitation au chromate. De même le ^{82}Br est précipité par nitrate d'argent alcoolique. Ces méthodes ne sont applicables que pour certaines substances seulement.

B) Méthode de lyophilisation.

Si tout le matériel radioactif doit être retenu, la fixation du tissu par lyophilisation de l'échantillon est la meilleure méthode et fut appliquée pour la première fois par Leblond. Après congélation dans l'isopentane refroidi à — 170° C avec l'azote liquide, le tissu est déshydraté par le froid et inclus dans la paraffine. L'émulsion sèche est alors pressée contre les coupes. Récemment Wilske et Ross (1960) recommandèrent la fixation du tissu par lyophilisation en phase vapeur avec du tétroxide d'osmium ou du paraformaldéhyde et l'inclusion sous vide dans le l'Epon. Des coupes de 1 micron peuvent être utilisées pour être recouvertes par l'émulsion d'une manière conventionnelle.

C) Méthode de « freeze-substitution ».

Dans cette méthode, la déshydratation sous vide est remplacée par la déshydratation par l'alcool. Gielink et collaborateurs (1966) décrivent une méthode dans laquelle le déplacement du calcium (45 Ca) hydrosoluble de tissu d'avoine peut être prévenue par l'utilisation de l'acétone comme liquide de déshydratation et en étendant les coupes dans l'eau pour les inclure dans une matrice de méthacrylate.

Toutefois, la méthode de lyophilisation n'évite pas une perte partielle ou une diffusion de substance hydrosoluble marquée à l'intérieur du tissu, puisqu'après lyophilisation, les échantillons doivent être inclus pour être coupés.

D) Techniques utilisant des coupes a congélation et de basses températures d'exposition.

Oster et coll. (1955) introduisirent les premiers une méthode pour couper des tissus non fixés et congelés avec le microtome à refroidissement, appliquant l'émulsion pendant le dégel et en exposant les autoradiogrammes à — 20° C. Plusieurs tentatives ont été faites pour prévenir la perte ou la diffusion de substances hydrosolubles en coupant le tissu dans un cryostat. Fitzgerald (1961) a décrit une méthode semblable pour la recherche de l'incorporation de thymidine 3 H et cytidine 3 H. Dans sa technique le tissu est congelé dans l'isopentane (— 170 ° C) coupé dans un cryostat (— 20° à — 30° C), déshydraté par lyophilisation à 0° C. Ce n'est que pour un instant pendant le montage de la plaque stripping sèche que les coupes sont exposées à la température ambiante. Les autoradiogrammes sont alors exposés à 20° C. En vue de prévenir la perte de la plaque stripping durant la procédure photographique, les autoradiogrammes sont immergés dans une solution à 10 % de formaldéhyde pendant 5 à 10 mn avant le développement.

Une méthode simple et efficace pour la détection autoradiographique de substances hydrosolubles fut mise au point par Appleton et Pelc (1965). Les coupes à congélation étaient montées en pièce sombre directement sur des lamelles préalablement réfrigérées et recouvertes de plaques stripping Kodak AR 10. Après exposition à des températures de 20° C à 30° C, les coupes étaient rapidement fixées et développées. Le contact étroit entre la coupe et l'émulsion produisait une très bonne résolution. La démonstration de l'activité de substances hydrosolubes était réalisée sur les autoradiogrammes.

APPLICATION DES DIFFÉRENTS ISOTOPES

I. — L'IODE 131 ET L'IODE 125

L'iode radioactive a été tout d'abord amplement utilisée dans les études sur le métabolisme de la glande thyroïde. Ultérieurement elle a été souvent utilisée comme marqueur pour l'étude du comportement de substances variées en autoradiographie. La plupart de ces études n'ont guère été fructueuses au niveau cellulaire. Cela est en partie dû à la haute énergie des électrons de l'iode 131 qui engendre une basse résolution. Dans l'avenir de meilleures perspectives pour l'emploi de l'iode dans les études autoradiographiques peuvent être envisagées par l'utilisation de l'iode 125. Puisque dans le cas de l'iode 125 (capture K) les électrons de conversion de basse énergie ont des énergies comprises entre 3 et 30 K eV la résolution devrait être semblable à celle du tritium. Cela devrait ouvrir un vaste champ dans les études autoradiographiques en général, dans l'étude du D.N.A. en particulier, Schultze (1965) montra que la ribonucléase marquée à l'iode 125 injectée en intraveineuses à des Souris est localisée dans les épithéliums des tubules proximaux du rein. Kyogoku et coll. (1964) injectèrent des anticorps marqués à l'iode 125 contre les sédiments de stroma d'hépatomes induits à la N 2 fluoroacétamide et de foie normal, chez des Rats normaux et porteurs de tumeurs, et trouvèrent dans les deux cas des anticorps localisés dans la paroi des sinusoïdes et le tissu conjonctif sur le foie porteur de la tumeur aussi bien que sur le foie normal.

A) Le métabolisme de l'iode de la thyroide.

Le métabolisme de l'iode dans la thyroïde a été amplement étudié par Leblond et ses collaborateurs, principalement à l'iode 131.

En accord avec les résultats obtenus chez les Rats normaux,

l'essentiel de l'iode radioactive fut trouvée dans les cellules qui apparaissent entourées 30 mn après l'injection intraveineuse d'iode radioactive. Au bout de ce temps, une petite quantité seulement de la radioactivité fut localisée dans la colloïde. Mais après 25 heures les autoradiogrammes montrèrent des taches rondes correspondant aux points de dépôt de l'iode radioactive dans la colloïde. 15 mn après injection Nandi et coll. (1956) trouvèrent la moitié de l'activité de l'iode 131 dans les cellules et l'autre moitié dans la colloïde (chez le Rat). Après 3 heures on montra que l'essentiel de l'iode 131 se trouvait dans la colloïde. L'iode était évidemment présente sous une forme organique liée puisqu'elle n'a pas été déplacée du tissu par fixation et déshydratation dans l'alcool.

Des études chimiques quantitatives par Borgorock et coll. (1951) montrèrent que 30 mn après l'injection d'iode 131 et après 24 heures de fixation dans le Bouin, 75 % de l'iode radioactive dans les cellules et 77 % dans la colloïde sont liées à la thyroglobuline. Après des intervalles expérimentaux plus longs une quantité importante d'iode devrait être liée aux protéines. Ces résultats suggèrent que l'iode circulante est continuellement liée à la thyroglobuline dans le cytoplasme des cellules, de préférence dans la région apicale correspondant à l'appareil de Golgi. Elle est alors déchargée dans la colloïde, cette phase étant rapide dans la thyroïde fonctionnelle et lente dans le tissu de thyroïde restant. Ce processus peut être accéléré par injection d'iode dans l'animal avant l'application d'iode radioactive ou par activation de la thyroïde par des hormones thyréotropes. Dans ces cas le dépôt de l'iode radioactive est exclusivement trouvé dans la colloïde également 1 heure après l'injection, d'autre part, le dépôt de l'iode radioactive peut être inhibée par hypophysectomie ou application de thyroxine. Après traitement des Rats à la thyroxine, Doniach et Pelc (1949) trouvèrent un dépôt d'iode radioactive uniquement dans les cellules et non dans la colloïde. L'administration d'hormone thyréotrope durant plusieurs jours ne rétablit pas un dépôt normal dans la colloïde, mais intensifie seulement l'effet d'anneau dans l'incorporation cellulaire.

Puisque l'iode radioactive liée aux protéines est trouvée très tôt dans la colloïde dans certains cas 2 minutes après l'injection, la possibilité de formation de la thyroxine à l'intérieur de la colloïde a été aussi discutée Leblond 1948). Des études autoradiographiques récentes avec des précurseurs animo-acides marqués ont montré que le composant protéique de la thyroglobuline est formé dans l'ergastoplasme des cellules vésiculaires. Ce n'est qu'après la sécrétion de colloïde dans la lumière de la

vésicule que le composant protéique est combiné avec de l'iode, formant alors la thyroglobuline finale. Toutes les expériences montrèrent que toutes les vésicules de la glande sont actives à tout moment par fixation d'iode. Toutefois le taux de fixation de l'iode par les différentes vésicules est variable. L'assimilation en iode la plus rapide et sa plus rapide disparition correspondante fut trouvée dans les vésicules les plus petites, les plus localisées au centre de la glande dans lesquels l'épithélium était relativement haut et dont la coloration était basophile. Une assimilation plus faible fut observée dans les plus grandes vésicules, située de façon périphérique avec une coloration acidophile relativement faible et qui sont encore radioactives après 48 heures. Des examens plus détaillés du rapport entre l'assimilation en iode et la taille des vésicules confirmèrent que le turn over d'iode dans les vésicules les plus petites semblaient le plus élevé, mais que si le turn over est étudié à la surface de la vésicule, il est alors identique pour tous. Puisqu'il y a proportionnalité entre la surface de la vésicule et le nombre des cellules épithéliales dans la vésicule, il est logique de conclure que toutes les cellules vésiculaires ont le même turn over d'iode.

Récemment, le métabolisme de l'iode dans la glande thyroïde fut étudié en microscopie électronique par l'autoradiographie à l'iode 125 et à l'iode 131. Le marquage fut trouvé seulement sur la colloïde et sur une étendue assez étroite des grandes vésicules cytoplasmiques.

B) Substances marquées a l'iode 131.

1) *Hormones.*

L'iode 131 a été largement utilisée comme marqueur pour la localisation autoradiographique de certaines substances. Ford et ses collaborateurs étudièrent la localisation des hormones thyroïdiennes marquées à l'iode 131 dans les tissus de Cochons d'Inde. Après injection de triodothyronine marquée, l'iode radioactive fut trouvée dans le cortex rénal, le parenchyme hépatique, le tissu alvéolaire du poumon, la pulpe rouge de la rate et dans les fibres musculaires cardiaques, squelettiques et lisses. Après injection de thyroxine, une localisation similaire mais considérablement moins intense et plus diffuse fut démontrable.

Erankô (1957) put démontrer par des procédés autoradiographiques la présence de noradrénaline et d'adrénaline marquées dans la médulla de surrénale du Hamster, de la Souris et du Rat après incubation à l'iodate marqué à l'iode 131. Nahara et coll. (1958) étudièrent le métabolisme de l'insuline et du glucaagon marqués à l'iode 131 dans le rein du Rat. Moins

de 2 minutes après l'injection, la radioactivité était importante, dans les lumières des tubes contournés proximaux. Après un temps plus long, la radioactivité devenait plus dense dans ces cellules. Les auteurs concluèrent que cette observation corrobore l'hypothèse selon laquelle les protéines peuvent être filtrées à travers la membrane glomérulaire et être réabsorbées dans les tubules. Sonenberg et coll. (1951) étudièrent le comportement de coupes d'antehypophyse marquées à l'iode 131 en relation avec l'activité hormonale adrenocorticotropique. Ils trouvèrent une rapide pénétration et disparition de la radioactivité dans la surrénale avec une concentration dans les couches internes du cortex surrénal. De l'iode 131 de préparations antéhypophysaires en activité hormonale prolactique fut mise en évidence dans l'ovaire, le corps jaune, le liquide folliculaire, la surrénale, le foie, la rate, le rein et la thyroïde, tandis qu'il n'y a pas de concentration significative de la radioactivité dans le tissu mammaire du Rat.

2) *Antigènes et anticorps.*

Warren et Dixon étudièrent le comportement d'antigènes marqués à l'iode 131 dans le choc anaphylactique du Cobaye. Des quantités significatives d'antigènes marqués ne furent trouvées que dans le foie et le poumon, la fixation et la distribution dans le foie furent les mêmes chez les animaux sensibilisés et non sensibilisés, tandis que la fixation par le poumon des animaux sensibilisés était deux fois celle des animaux témoins. Une concentration de l'antigène fut trouvée dans le tissu bronchique fibreux qui semblait être un couplage de l'antigène avec son site de réaction spécifique et la paroi bronchique.

Sur les autoradiogrammes de tumeurs cérébrales et sur le tissu cérébral adjacent, après injection d'anticorps antigliomes marqués à l'iode 125, on trouva une localisation non spécifique des anticorps distincte de la localisation des cellules tumorales.

II. — LE SOUFRE 35

Le soufre 35 a une période de 87,1 j. et se désintègre en produisant des particules β. Son application pour les études autoradiographiques de processus métaboliques dans la cellule est limitée à deux problèmes principaux :

— un groupe d'investigations emploie les animo-acides marqués au soufre 35 pour étudier le métabolisme protéique tandis

que l'autre groupe emploie du sulfate S 35 en vue d'examiner l'incorporation de celui-ci dans les sulfomucopolysaccharides. Les résultats de premier groupe d'expériences sont à mettre en rapport avec ceux obtenus en utilisant des acides animés tritiés et ceux-ci fournissent plus de détails du fait de la meilleure résolution engendrée par leurs électrons.

A) Métabolisme des sulfomucopolysaccharides chez l'animal.

L'essentiel du sulfate marqué au 35 S est rapidement excrété par l'organisme des mammifères. Seule une faible partie est incorporée dans les sulfomucopolysaccharides et aucune fraction ne l'est dans les protéines. Des plantes et des microorganismes toutefois, sont capables de synthétiser les acides aminés à partir de sulfates inorganiques ce qui permet ainsi de suivre le métabolisme protéique par application du sulfate marqué au S 35 (Howard et Pelc). Le cartilage des mammifères, le tissu conjonctif, les parois des vaisseaux, les membranes basales et les substances muqueuses contiennent de la chondroïtine sulfate ou de la mucoïtine sulfate comme fraction sulfopolysaccharidique de muco ou glucoprotéines. Les études autoradiographiques de l'incorporation de sulfate S 35 dans différentes cellules de l'organisme constituent une méthode pour l'investigation du turn over des sulfomucopolysaccharides.

1) *Cartilage.*

Le sulfate marqué au 35 S est incorporé dans différents types de cartilage qui restent radioactifs quand l'activité du soufre 35 a disparu de tous les autres tissus de l'organisme. Par analyse chimique il a pu être montré que l'essentiel du sulfate 35 S est incorporé dans l'acide chondroïtine sulfurique. On constate ultérieurement que l'intensité de l'incorporation du sulfate 35 S correspond à la localisation des sulfomucopolysaccharides colorables (Amprino, 1959).

Le cartilage épiphysaire des os longs montre l'incorporation du sulfate 35 S la plus intense. Des expériences à court terme ont montré que le marquage de l'acide chondroïtine sulfurique apparaît le plus actif dans les cellules en colonne hypertrophiées alors que les cellules cartilagineuses incorpore le 35 S à un assez bas degré. Au fur et à mesure que le temps passe, les sulfomucopolysaccharides passent dans la substance intercellulaire et l'activité 35 S change de plus en plus dans la zone d'ossification. Chez la Souris, le Rat et le Lapin, l'activité 35 S est localisée dans les îlots cartilagineux entourant les travées osseuses 7 jours

après l'injection de sulfate 35 S et après 15 jours dans les travées osseuses métaphysaires.

L'incorporation du sulfate 35 S dans le cartilage hyalin est moins intense que dans le cartilage épiphysaire, mais le premier montre une incorporation plus élevée que dans le cartilage fibreux articulaire. Les chondrocytes mûrs de la périphérie du cartilage hyalin synthétisent des sulfomucopolysaccharides plus activement que les chondrocytes immatures du périchondre et de la région sous-périchondrale. Avec le temps la substance marquée passe dans la substance intercellulaire (Pelc et Gluckmann, 1955).

Des expériences *in vitro* avec du cartilage humain montrent également une incorporation intracellulaire du 35 S en acide chondroïtine sulfurique dans les chondrocytes. Une comparaison des taux de turnover des sulfomucopolysaccharides dans les cartilages d'animaux jeunes et vieux montra des taux décroissant du turnover avec l'augmentation de l'âge. On ne trouva pas d'incorporation au 35 S dans du cartilage en dégénérescence (Bélanger, 1954).

Larrson (1960) et coll. étudièrent la localisation et le métabolisme des sulfomucopolysaccharides en relation avec le développement du palais secondaire chez les Souris. Ils trouvèrent un métabolisme très actif des sulfomucopolysaccharides dans la zone fibroélastique et conclurent que ceux-ci donnent à la substance fondamentale des rayons palatins la possibilité de subir des changements de forme, condition préalable pour la fermeture du second palais.

La synthèse des sulfomucopolysaccharides n'est pas influencée par les rayons X, mais est considérablement inhibée par des doses élevées de vitamine A et de cortisone.

Des extraits de foie d'autre part ont un effet stimulant particulier sur l'incorporation du soufre 35.

2) *Os.*

Tonna et Cronkite (1959) trouvèrent une incorporation importante du soufre 35 dans les ostéoblastes, bien que ces cellules ne montrent pas une réaction de coloration métachromatique. Les auteurs assurent que l'acide chondroïtine sulfurique passe rapidement dans la substance préosseuse, où elle réagit comme agent du couplage entre le collagène et les cristaux d'apathite. Il y a une proportionnalité entre l'incorporation du sulfate 35 S et la croissance, avec l'augmentation de l'âge l'incorporation du sulfate 35 S diminue (Tonna et Cronkite, 1960). Un effet semblable est provoqué par des substances inhibant la croissance.

Des études autoradiographiques montrent que le thiouracile, la thyroïdectomie, un traitement à l'iode 131 de même que le magnésium aboutissent à une inhibition de l'incorporation du sulfate 35 S. Inversement le fluorure de sodium conduit à une augmentation de la synthèse de l'acide chondroïtine sulfurique dans le cartilage et les os des animaux en croissance. Il a pu être montré par autoradiographie qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'incorporation dans le tissu calleux des fractures osseuses pendant la première semaine. L'incorporation était double de la normale après trois semaines et revenue à la normale après 8 semaines. Aussi dans le cas de fractures l'incorporation du soufre 35 apparaît à l'intérieur des cellules dans les ostéoblastes et les ostéoclastes.

3) *Tissu conjonctif.*

En accord avec les quantités d'acide chondroïtine sulfurique et d'acide hyaluronique dans le tissu conjonctif, une incorporation relativement intense de sulfate 35 S dans le tissu conjonctif de différents endroits du corps fut mise en évidence. Dans le derme, l'activité du 35 S était distribuée de façon relativement égale (Bostrom et coll., 1953). L'incorporation dans la média prédomine dans les parois des grands vaisseaux, en opposition avec l'activité moins intense du 35 S dans l'intima et l'adventice Bostrôm). En général il y a une proportionnalité entre l'intensité du métabolisme du sulfate 35 S et la taille du vaisseau (Bélanger, 1954). Kunz et Braselmann (1965) trouvèrent une incorporation significativement plus élevée du 35 S 04 dans l'aorte thoracique ascendante que dans l'aorte descendante thoracique et l'aorte abdominale des Rats. Dans tous les segments de l'aorte, la plus haute incorporation du sulfate 35 S apparaît dans le tiers le plus intérieur de la média, la plus faible dans le tiers extérieur.

L'incorporation dans le tissu conjonctif apparaît à l'intérieur des cellules dans les fibroblastes et aussi dans les fibrocytes avec un transfert plus tardif à la substance intercellulaire. Le taux d'incorporation est le plus élevé chez les jeunes animaux et diminue avec l'augmentation de l'âge.

L'incorporation du sulfate 35 S dans les processus athéroscl érotiques fut étudiée par Buch (1955). L'accroissement de l'incorporation dans les plaques de l'intima et de la média fut mise en évidence ; comme l'activité du soufre 35 est la plus élevée dans les fibroblastes la synthèse de l'acide chondroïtine sulfurique se produit nécessairement dans ceux-ci. Un accroissement de l'incorporation de sulfate 35 S fut trouvé au cours des processus inflammatoires, dans les tissus de granulation, dans

l'environnement des transplants de tumeur et aussi après administration de vitamine C, tandis que dans le scorbut, l'incorporation du soufre 35 en sulfomucopolysaccharide est troublée. De façon semblable aux résultats obtenus avec le cartilage, la cortisone conduit à une inhibition de l'incorporation du sulfate 35 S.

La synthèse de chondroïtine B, d'héparitine sulfate et de kératosulfate dans les septacirrhotiques fut constatée par des méthodes combinées de coloration, de digestion enzymatique différentielle et d'autoradiographie, dans les cirrhoses expérimentales de Rats.

4) *Autres tissus.*

Le sulfate 35 S est incorporé dans les épithéliums épidermiques des animaux adultes (Boström), dans la couche extérieure des racines de poil et dans l'épithélium de la langue et des préestomacs (Oehlert, 1968).

Une haute incorporation du sulfate au soufre S 35 fut trouvée dans les mastocytes du tissu conjonctif dans tout l'organisme. L'activité maximale des mastocytes fut observée 6 à 48 heures après l'injection du sulfate 35 S suivant l'âge des animaux.

Certaines cellules de la moëlle osseuse comme les mégacaryocytés du Hamster (Bélanger, 1954) incorporent du sulfate 35 S *in vivo* et *in vitro*. Une concentration élevée du 35 S fut observée dans les mégacaryocytes de Cobayes aussi bien que dans les fibroblastes de blessures en voie de cicatrisation.

Lajtha et coll. trouvèrent une incorporation intense du 35 S dans les cellules myéloïdes des cultures de cellules osseuses humaines, mais la nature chimique de la substance marquée au 35 S de nature non sulfomucopolysaccharidique reste inconnue.

En général, l'incorporation du 35 S par le foie, le rein, le pancréas et le système nerveux central est insignifiante. Aussi les cellules tumorales des tumeurs du tissu conjonctif ne doivent-elles pas montrer une incorporation importante du soufre 35.

5) *Les cellules secrétant du mucus.*

Une incorporation intense du sulfate 35 S apparaît dans les différentes cellules secrétant du mucus du tractus gastro-intestinal qui produisent des substances muqueuses contenant du soufre. Une haute incorporation du sulfate 35 S fut trouvée dans les muqueuses épithéliales des glandes salivaires, tandis que les épithéliums des parties séreuses montrèrent seulement une incorporation insignifiante au soufre 35. Quelques heures après l'injection du sulfate 35 S les fovéola des membranes muqueuses gastriques montrèrent une incorporation intense du soufre 35,

tandis que les épithéliums superficiel et les régions basales des glandes montrent une activité assez faible.

A l'intérieur des cellules en gobelets, le soufre 35 fut d'abord localisé dans la région supranucléaire ou de Golgi avant d'être distribué à l'intérieur de la mucine intracellulaire. Ultérieurement le mucus de la surface contient une importante activité S 35. Ce changement de l'activité en 35 S fut expliqué par le mouvement des cellules de la fovéola à la surface.

III. — LE PHOSPHORE 32

Le phosphore 32 a une période de 14,5 jours, en se désintégrant il émet des particules β.

A) Formation et minéralisation des os et des dents.

Si l'on met à part les études concernant le D.N.A., le phosphore 32 a été utilisé comme marqueur pour étudier la formation et la minéralisation des os et des dents. Percival et Leblond (1948) étudièrent l'incorporation du 32 P dans les os et les dents et trouvèrent une entrée rapide et une déposition aux points d'ossification des os des Rats nouveau-nés et des Souris, une observation suggérant que les structures osseuses sont constamment renouvelées à un taux rapide. En étudiant le devenir des os nouvellement formés, on remarque que la diaphyse du tibia et celle de l'humérus revêtent une triple origine : périostique dans sa portion moyenne, endostéale près des plateaux épiphysaires. Le comportement d'échange des jeunes os et des dents *in vitro* est comparable au comportement d'échange dans des conditions *in vivo*. Du tissu normal jeune échange du 32 P à un taux plus élevé que dans les vieux tissus, dans les os en croissance plus que dans l'os normal, dans le cementum des dents humaines adultes plus que dans la dentine et dans la dentine plus que dans l'émail (Bélanger, 1953).

Ces recherches furent confirmées par Englelt (1953) et coll. qui trouvèrent que le système haversiens d'os de jeunes Chiens ont la plus haute incorporation de 32 P, tandis qu'avec l'âge, la quantité de sels minéraux dans l'os tend vers un maximum et que l'incorporation du 32 P devient très faible.

Chez des Porcs nourrissons, Comar et coll. (1952) distinguèrent par des images autoradiographiques des régions osseuses d'origine périostée à déposition relativement lente et des régions endochondrales à déposition rapide.

Amprino étudia l'incorporation *in vitro* du 32 P dans des os de jeunes Chiens et rapporta une incorporation élevée du 32 P dans les substances calcifiées intercellulaires. Une haute concentration en 32 P dans les cals d'os en voie de guérison fut observée par Ruf et Philip (1950-1951).

Chez les Oiseaux, Smith et coll. (1957) trouvèrent l'incorporation en 32 P dans des os contenant de la moëlle plus élevée que dans les os pneumatisés et conclurent que la présence de moëlle osseuse a une influence sur l'échange phosphaté.

La vitamine D intensifie le métabolisme du phosphate 32 P tandis que l'hormone parathyroïde diminue le taux de renouvellement de phosphate osseux chez de jeunes animaux et augmente celui des animaux âgés.

B) Le phosphore 32 comme marqueur des composés chromés particuliers.

L'injection de phosphate chromique contenant du 32 P a été utilisé pour étudier son incorporation par des cellules du système réticulo-endothélial de Souris, de Rats et Lapins et de Chiens. Dans le foie, l'incorporation du phosphate chromique colloïdal marqué au 32 P apparaît dans les cellules de Kupffer en plages irrégulières sans rapport avec la lobulation du foie.

Des infections ou des irradiations aux rayons X altèrent cette distribution caractéristique. Un choc thermique provoque le relargage du matériel radioactif précédemment phagocyté par ces cellules, qui apparaît alors dans le sang périphérique.

Dans la rate, le matériel radioactif fut localisé dans de grandes cellules à la périphérie des follicules et à une petite partie irrégulière dans la pulpe rouge. L'incorporation dans les cellules réticulo-endothéliales des parois capillaires du poumon fut observée.

IV. — LE CARBONE 14

Le carbone 14 a une période de 5.600 années, il se désintègre en émettant des électrons. Des amino-acides marqués au 14 C et des précurseurs d'acides nucléiques marqués au C 14 ont été amplement utilisés dans les études sur le métabolisme des protéines. D'autre part, le carbone 14 a été utilisé comme traceur dans la recherche de la localisation et de la distribution de différentes substances dans les tissus, comme Roth et son équipe l'ont montré pour des substances hydrosolubles marqués

au carbone 14 dans le cerveau (Roth et Barlow, 1961). Dans la plupart des cas ces études montrèrent seulement une grande distribution et n'ont pas permis la démonstration de l'activité au niveau cellulaire. Seules des recherches avec marquage au 14 C au niveau cellulaire seront considérées ici.

L'assimilation du bicarbonate marqué au 14 C par les os et le cartilage épiphysaire de Rats nouveau-nés fut étudié par Greulich (1956). La localisation du C 14 apparaît d'abord dans les composés organiques des os et des cartilages épiphysaires plutôt que dans leur portion minérale. On démontre que l'incorporation était surtout effectuée dans des protéines nouvellement synthétisées, spécialement le collagène et partiellement la chondroïtine sulfate dans le cartilage. Une observation sur une période de 3 jours montra que la matrice marquée est formée par les chondrocytes et passe sur le stroma environnant. Le taux avec lequel les chondrocytes synthétisent et secrètent la matière marquée varie dans différentes régions du cartilage épiphysaire. Cette variation a donné des renseignements sur la rapidité de la croissance interstitielle du cartilage et la relative rapidité avec laquelle la matrice est renouvelée.

Etudiant l'incorporation du glucose uniformément marqué au 14 C par la matrice dentaire, Kumamoto et Leblond (1958) trouvèrent que le glucose est incorporé par la matrice adamantine, qui est disposée en couches en contact étroit avec l'apex des adamantoblastes. Ultérieurement, de l'émail nouveau fut formé et la couche radioactive devenue plus large et moins intense, fut trouvée dans la zone de calcification. Les auteurs conclurent que le glucose a été incorporé dans des molécules de grande taille à turnover rapide.

Dans l'organe dentin, la glucose a été dans la matrice prédentine où il est arrangé en couches en contact étroit avec l'apex des odontoblastes.

Durant la formation du dépôt, la couche radioactive apparaît dans la zone calcifiée. Elle resta à une distance constante de la jonction dentine émail et garda la même intensité durant une période expérimentale de 6 mois.

Des résultats semblables furent obtenus pour la formation et le devenir de la matrice organique de la dentine par injection de bicarbonate de sodium marqué au 14 C chez des Rats nouveau-nés (Greulich et Leblond, 1954). L'isotope était incorporé dans la matrice organique de l'organe adamantin. En accord avec ces résultats expérimentaux, la formation de la dentine apparaîtrait en 3 étapes :

1° Formation d'une matrice charpentée, vraisemblablement

un collagène qui apparaît d'abord au sommet des odontoblastes (le matériel collagène était vraisemblablement la substance qui était marquée au moyen des 14 C) ;

2° Addition de grandes quantités de matériel carbohydraté à la trame de la matrice passant de prédentine en dentine ;

3° L'apparition de phosphate de calcium dans la matrice dentine.

Récemment Wasserman et Bélanger (1961) étudièrent le comportement du lactose 14 C injecté dans la lumière d'iléons liés de Rats et trouvèrent qu'il peut pénétrer directement dans les cellules muqueuses de l'épithélium avant hydrolyse. Puisqu'il n'y a pas de mise en évidence de la présence du glucose ou du galactose à l'intérieur de l'épithélium intestinal, l'activité observée dans les cellules muqueuses devait être rattachée au lactose plutôt qu'à un produit d'hydrolyse. Cela pourrait être confirmé par des chromatogrammes et des autoradiogrammes d'homogénats muqueux.

Fitzpatrick et Kukita (1956) démontrèrent l'incorporation de la tyrosinase marquée au C 14 dans les mélancocytes normaux, les pigmentaires et les mélanomes malins avec une incorporation de la tyrosine uniquement dans les cellules malignes du mélanome.

Scott et Kalz (1956) utilisèrent le marquage au 14 C pour démontrer la pénétration et la distribution de l'hydrocortisone dans la peau humaine après application topique. Après une heure le matériel radioactif était visualisé dans l'épiderme et après 2 heures le matériel tracteur était concentré dans la couche basale. Après 6 heures le carbone 14 était identifié dans le derme autour des vaisseaux sanguins et il avait entièrement disparu de la peau après 16 heures. L'application d'hormones à la peau irradiée aboutit à une pénétration plus rapide avant et durant l'érythème primitif.

Waser et Lüthi (1956-1957) étudièrent la localisation de la curarine de la calebasse marquée au 14 C et du décaméthonium marqué au 14 C injectés dans des Souris. Dans les autoradiogrammes de préparation congelée de diaphragmes prélevés immédiatement après la mort, ils trouvèrent une concentration de l'activité en C 14 directement sur les plaques motrices.

Ultérieurement Waser (1958) étudia l'influence de la phrénicotomie sur l'incorporation de la curarine 14 C par les plaques terminales et compara les autoradiogrammes avec la quantité de cholinestérase dans les plaques terminales colorées par la méthode de Koelle. La cholinestérase et la radioactivité disparurent au même moment et au même degré après la déner-

vation et furent complètement perdues après 60 jours. Les auteurs conclurent de ces expériences que les fonctions cholestératiques et réceptrices dépendent chacune l'une de l'autre mais ne sont pas localisées au même endroit bien qu'elles doivent être situées à une distance plutôt faible l'une de l'autre.

Cencer (1958) étudia par autoradiographie l'incorporation du 14 CO_2 dans les gastrulas d'axolotl. La plus haute activité en 14 C fut trouvée dans le neuroblaste puis dans l'ordre décroissant dans l'hectoblaste, le chordomésoblaste et l'endoblaste. Ces différences affectèrent seulement le cytoplasme car les noyaux étaient toujours très marqués. Dans la gastrula plus âgée, les noyaux montraient les mêmes gradients d'activité que le cytoplasme.

V. — LE FER 59

Le fer 59 a une période de 45,1 j. et se désintègre en émettant des rayons β.

A) Formation des cellules de la lignée rouge.

L'utilisation du fer radioactif pour les études de la synthèse de l'hémoglobine dans les cellules du système hématopoïtique semble d'une valeur évidente. Des autoradiogrammes de frottis de moelle osseuse d'animaux ayant reçus au préalable du fer radioactif permet la détermination des étapes du développement des érythrocytes dans lesquels le fer est incorporé et aussi une estimation du temps dépensé par l'érythrocyte aux différentes phases de son développement. Austoni (1954) injecta des Rats par voie intrapéritonéale avec du 59 Fe à l'état de chlorure ferrique. Après 3-6 heures le fer radioactif apparut en quantités significatives dans toutes les étapes de l'érythropoïese. Le fer marqué était présent en quantités appréciables dans toutes les phases de l'érythropoïèse.

La saignée des Rats conduit à l'hyperplasie de la moelle osseuse et au changement du métabolisme du fer entre les différentes étapes du développement avec un pic à la phase polychromatique et une activité plus élevée dans les érythroblastes basophiles. Dans l'incubation *in vitro* de la moelle osseuse humaine, Lajtha et Luit (1955) montrèrent que l'incorporation du fer est restreinte aux cellules rouges nucléées et aux réticulocytes. Aucune différence dans l'incorporation du fer ne fut observée entre les normoblastes et les mégaloblastes.

Krauss et Morrison (1955) étudièrent l'incorporation *in vitro* du 59 Fe dans l'hémoglobine dans la moelle osseuse d'un malade atteint d'anémie falciforme. Toutes les cellules rouges sanguines nucléées contenaient du fer radioactif après incubation de 3,25 heures à 37°. La majeure partie du fer 59 était trouvée dans ou à côté du noyau.

Dans des autoradiogrammes de moelle osseuse de Rat ayant reçu une injection intraveineuse de Fe 59, Harris (1956) trouva qu'il y avait une incorporation immédiate dans tous les types cellulaires et que moins de 2 heures après l'injection pratiquement tous les normoblastes et les érythrocytes polychromatiques étaient actifs. Ces derniers restent 100 % actifs jusqu'à 24 heures après l'injection. Après ce temps, le pourcentage de cellules actives de ce type commence à tomber et presque toute l'activité a été relâchée de la moelle dans le torrent circulatoire en moins de 48 heures. L'auteur conclut que le temps de passage du normoblaste primitif dans la moelle à l'érythrocyte polychromatique dans le sang est donc aux alentours de 2 jours.

Le turnover du fer dans la moelle osseuse est diminuée notablement chez les Rats ayant subi la thyroïdectomie mais se trouve rapidement et pleinement restaurée après traitement aux extraits thyroïdiens. (Austoni et coll., 1956.)

Brahma et coll. (1961) trouvèrent une assimilation significative du fer 59 par les mégacaryocytes de la moelle osseuse du Rat. Une évaluation quantitative par comptage de grains montra que l'incorporation totale du fer radioactif par cellule augmente avec le nombre de lobulations nucléaires.

B) Assimilation par différents tissus.

Ziliotto et Odeblad (1955) trouvèrent que le fer radioactif injecté en sous-cutané à des Souris pénètre l'épithélium dans différentes parties du tractus digestif. Les épithéliums squameux incorporent des quantités plus faibles que les épithéliums en plateau. Dans le pancréas, la glande exocrine incorpore des quantités plus importantes que la glande endocrine. Durant les premiers jours après l'injection les structures du cortex rénal (exceptés les glomérules) contiennent une quantité relativement importante de fer radioactif. Neuf jours après l'injection le fer radioactif était principalement localisé dans les tubes contournés proximaux.

VI. — LE CALCIUM 45

Le calcium 45 a une période de 164 jours et se désintègre en émettant des rayons β.

A) Minéralisation des os.

Le calcium 45 a été utilisé dans plusieurs études sur la minéralisation des os et des dents.

Pecher (1942) injecta du 45 Ca en intraveineuse à des Souris et trouva une rapide concentration dans le squelette spécialement dans les zones d'os et de dentine nouvellement formés comme les racines des dents, les lignes épiphysaires ou les os fracturés. L'os spongieux concentre une quantité plus importante de radioactivité par milligramme de phosphate de calcium inorganique que le compact. Chez les animaux adultes il a été montré application du 45 Ca, que dans l'os compact jeune, les ostéons incomplètement calcifiés sont les seuls à être intensément radioactifs. (Lacroix 1953, Ponlot 1958.)

Dans l'émail de Rats en croissance, Leblond et coll. (1955) trouvèrent une différence très accusée entre l'apparition de la matrice et celle des minéraux, puisque le dépôt des composants de la matrice apparaît longtemps avant ceux des minéraux (32 P phosphate, ion 45 Ca). Dans le cartilage, la calcification apparaît seulement dans le tissu dégénéré, dans lequel la matrice de formation s'est arrêtée. En accord avec les recherches de Leblond et coll. (1955), dans la dentine et vraisemblablement dans l'os, la matrice est formée en deux étapes : tout d'abord la prédentine (ou la préosséine) est formée. L'addition de chondroïtine sulfate contribue à la transformation en matrice de vraie dentine (ou d'osséine vraie) qui est capable de fixer et de transformer les seuls de calcium et de phosphate en cristaux de dents ou d'os.

Chez les os âgés, la fixation du 45 C est rapide et virtuellement irréversible durant une période d'observation de trois semaines et la concentration dans les os neufs augmente légèrement entre 1 et 24 heures après l'administration de 45 Ca. Arnold et Jee (1954) traitèrent des préparations d'os non décalcifiés de lapin qui avaient reçus du 45 Ca avec des solutions variées en vue de déterminer le contenu de calcium échangeable. Ils trouvèrent qu'une quantité considérable de calcium peut être extraite ou échangée avec du calcium stable en utilisant de l'acétate de calcium si le temps entre l'application du 45 Ca et le sacrifice de l'animal est de moins de 24 heures. De ces recherches, les auteurs conclurent que l'essentiel du calcium

incorporé par le squelette est d'abord fixé par processus d'échange d'ions. Les différences entre les possibilités d'échanges *in vitro* indiquent que seules les couches superficielles du cristal sont impliquées dans ces processus d'échange. L'incorporation du calcium dans le centre du cristal peut apparaître seulement par apposition du nouveau matériel osseux.

Le turnover de la partie minérale du squelette est dûe en fin de compte à trois processus : 1) l'accumulation primaire et la fixation des sels minéraux dépendant de la présence des ostéoblastes ; 2) les processus de recristallisation ; 3) les processus d'échange d'ions limités aux parties superficielles. Dans la formation osseuse ces trois processus peuvent prendre place au même moment ; dans l'os adulte les deux derniers processus prévalent.

B) Minéralisation des dents.

Le calcium 45 a été également utilisé dans l'étude de la minéralisation des dents. Sur des incisives de porcs après application de calcium 45, Bélanger et coll. trouvèrent une bande autoradiographique apparaissant d'abord sur les zones de formation de la dentine et se déplaçant vers l'extérieur avec le temps à un taux inversement proportionnel à l'âge du tissu. Sur le cément une bande semblable fut trouvée mais se déplaçant vers l'intérieur.

C) Le 45 Ca dans les autres tissus.

La pénétration du Ca 45 dans la peau et les autres tissus mous du Rat a été étudiée par Bélanger. L'essentiel du calcium qui pénètre dans le follicule pileux est trouvé dans la zone kératogène.

Ce fait que le calcium 45 pénètre dans le même endroit du follicule pileux où sont incorporés la méthionine et la cystine pourrait indiquer une relation entre les protéines soufrées et le calcium dans la peau.

Eraniski (1957) étudiant le métabolisme du calcium du tissu nerveux périphérique trouva que la pénétration du 45 Ca dans le tissu nerveux était plus rapide que celle du 32 P. Le 45 Ca dans les cellules nerveuses est localisé à la partie périphérique du péricaryon et coïncide avec les corps de Nissl. Le noircissement dû au 45 Ca était graduellement transféré au neurone, mais n'a jamais pénétré le noyau. Dans les fibres nerveuses le 45 Ca était localisé à l'axone, mais non à la gaine de myéline.

VII. — STRONTIUM 90, STRONTIUM 89 ET STRONTIUM 85

La plupart des études autoradiographiques concernant le comportement biologique d'isotopes radioactifs non physiologiques ont été faites principalement dans le but de déterminer les effets de leurs rayonnements sur l'organisme.

A cause de son affinité pour le squelette, et à cause de leurs importants produits de fission dans une explosion atomique, des strontiums tels que le 90 Sr et 89 Sr sont utilisés en priorité pour l'étude de leur métabolisme dans les os.

Le risque de choc radioactif est sérieux malgré tout. Le strontium est traité par l'organisme de la même façon que le calcium. Son intérêt est énorme dans l'étude des tumeurs osseuses. Nilson et Ullberg (1962) ont utilisé du strontium 90 pour l'étude de la distribution des métastases d'ostéosarcomes transplantés chez la Souris. A cause de la haute affinité des tumeurs pour le strontium 90, de très petites métastases pourraient être déterminées dans les préparations. D'autre part les tumeurs osseuses induites au strontium montraient un niveau de strontium 90 faible. On a utilisé récemment du Sr 85 pour améliorer l'autoradiographie au strontium des ostéosarcomes. L'utilisation du 85 Sr qui se désintègre par capture K, fournit une meilleure résolution autoradiographique. Le strontium 90 (de période de 27,7 années, émetteur de rayons β) devrait être utilisé pour des expériences à long terme plus que le Sr 85, de période plus courte de 64 jours.

VIII. — AUTRES ISOTOPES

A) Terres rares.

L'yttrium, 90 Y et 91 Y, se dépose également dans les os. Le 90 Y produit à long terme par désintégration *in vivo* de dépôts de 90 Sr chez de jeunes Chiens ne peut échapper des zones des os dans lesquels il est produit..

Pour cette raison, les deux éléments, le 90 Sr et son produit le 90 Y irradient le squelette (Arnold 1955). Rayner et coll. (1953) trouvèrent la concentration la plus élevée en 90 Y dans les os de Lapin au-dessous de la ligne épiphysaire tandis qu'il n'y en avait qu'une faible quantité dans les régions endostéales et périostique. Une déposition du 91 Y dans le canon suggère une association avec le tissu conjonctif autour des vaisseaux sanguins.

Après une injection de 90 Y Cl 3 chez les Cobayes, Graul

et Hundeshagen (1958) trouvèrent une accumulation de 90 Y dans les cellules de Kupffer et les canaux biliaires.

Le Cérium 144 Ce est incorporé par la matrice organique des cartilages et des os.

Le Lutétium 177 Lu, injecté dans la glande mammaire des chiennes se localise dans les ganglions lymphatiques régionaux.

B) Eléments transuraniens.

Le Plutonium 239 Pu est d'abord déposé dans le squelette. A la différence du strontium, il n'est pas incorporé dans la structure minérale, mais dans la matrice organique.

Le Cirium 242 Cm et l'Américium 241 Am se déposent principalement dans les régions endostéales et périostiques couvrant l'os spongieux.

C) Autres éléments.

Le Polonium 210 Po, fut le premier élément utilisé pour la détection autoradiographique d'un isotope dans le matériel biologique.

Du 210 Po, injecté à l'état de chlorure chez le Rat est déposé en agrégats dans le foie et la rate tandis que du Polonium non particulaire était concentré dans les tubes contournés proximaux du rein. Les agrégats étaient repris par le système réticulo-histiocytaire.

Le radium Ra est localisé en petites surfaces de haute concentration irrégulièrement distribuées dans les os spongieux et compacts, principalement autour des canaux de Havers.

Après avoir fait inhaler du radon à des Souris, Schraub trouva une concentration très élevée de traces α dans le tissu adipeux.

Le Chorium X, injecté en sous-cutané à des Rats, fut accumulé dans les glomérules et les tubules du cortex rénal, dans les épithéliums pigmentés de la rétine, dans les os spongieux, spécialement dans les régions en voie de calcification.

Le thorotrast, bioxyde colloïdal de thorium, se dépose principalement dans le système réticulo-endothélial du foie, de la rate, et de la moelle osseuse.

L'uranium 233 U, s'accumule de façon substantielle dans les os. Ultérieurement il se dépose dans le cortex rénal, c'est-à-dire, dans les épithéliums tubulaires des tubes contournés proximaux. On le trouve de même dans les cellules de Kuffer.

Le gallium radioactif, 72 Ga, a été identifié dans les zones de grande activité ostéogénique, jonction épiphysaire, cals de fractures, ostéosarcomes.

L'arsenic radioactif, 73 As et 74 As, injecté en intraveineuse chez la Souris est accumulé dans l'épiderme. Le 76 As porté dans la dentine, ou exposé à la pulpe, ne pénètre pas que dans la pulpe, mais est absorbé dans une large mesure par la dentine.

Le zinc radioactif, 65 Zn, donné à des malades à l'agonie sous forme de chlorure, fut retrouvé dans les premières formes de la lignée hématopoiétique ; des frottis de moelle osseuse pour l'autoradiographie furent utilisés Les mégacaryocytes en étaient lourdement chargés et à un degré moindre les leucocytes mûrs.

Des autoradiogrammes de tissu prostatique montrèrent un dépôt de 65 Zn principalement dans les follicules de petite taille.

Une injection intrapéritonéale d'or colloïdal radioactif 198 Au, aboutit à une concentration d'or radioactif dans le foie, l'estomac, la rate, surtout d'une manière focale. Dans le rein l'essentiel de l'activité fut trouvée dans les glomérules.

Le mercure radioactif 203 Hg, fut trouvé à la concentration la plus élevée dans le rein, dans le foie et dans la rate après injection sous-cutanée de chlorure mercurique.

La présence de cobalt radioactif, 60 Co, peut être montrée dans les cellules tumorales, principalement dans le noyau.

La cadmium radioactif, 115 Cd, fut trouvé également distribué dans le foie des Rats. De même le rein, le pancréas et la rate en présentèrent.

IX. — CATIONS ET ANIONS HYDROSOLUBLES

Le potassium radioactif, 42 K, injecté à des Rats, se concentre surtout dans les cortex cérébraux et cérébelleux, les ganglions et la base du quatrième ventricule. Dans le rein, l'assimilation corticale est considérablement plus élevée que dans la médulla.

Le sodium radioactif, 22 Na, injecté en intraveineuse à des Souris et des Lapins fut trouvé à la concentration la plus élevée dans les dents, le cartilage, l'os et dans les muscles papillaires du cœur.

Le brome radioactif, 82 Br et 80 Br, est éliminé dans le suc gastrique après injection intraveineuse.

Dans le cerveau, il a été trouvé dans la couche granuleuse, un peu moins dans la couche moléculaire et enfin dans toutes les fibres nerveuses.

X. — LE TRITIUM 3 H

Le tritium 3 H a une période de 12,4 années, il se désintègre en émettant des particules β de basse énergie, donc à haut pouvoir de résolution microscopique. Le tritium est utilisé pour marquer la plupart des acides aminés : la tyrosine, l'alamine, la phénylalanine, l'arginine, la leucine.

D'où sa première application dans l'étude du métabolisme protidique.

Il est également utilisé pour marquer la thymidine, d'où son utilisation dans l'étude du métabolisme des acides nucléiques.

A) Synthèse intracellulaire de protéines.

Contrairement à ce qui se produit dans le marquage du D.N.A., l'application d'acides aminés radioactifs a pour résultat un marquage simultané du noyau et du cytoplasme. 2 à 5 mn après l'injection chez des Souris et des Rats le noyau et le cytoplasme de la cellule sont marqués.

1. *Le cytoplasme.*

Dans des cellules d'animaux adultes normaux il a été généralement observé que le marquage du cytoplasme est pratiquement uniforme (sauf durant les premières minutes). Dans des cellules ganglionnaires on a observé que le marquage cytoplasmique est distribué avec la substance des corps de Nissl.

Schultze (1962) a montré que 2 minutes après l'injection de leucine tritiée, les grains sont presque exclusivement localisés sur le cytoplasme des cellules acineuses du pancréas de Rat.

Dans les études réalisées au microscope électronique combinées à l'autoradiographie, le marquage initial de l'ergastoplasme et sa migration ultérieure vers le complexe de Golgi a été observée par plusieurs auteurs dans les cellules d'organes sécrétant des protéines comme les cellules ganglionnaires.

On considère que la fonction de l'appareil de Golgi est d'« empaqueter » les molécules protéiques pour l'excrétion.

Toutefois les résultats des investigations plus récentes indiquent que de petites molécules protéiques sont combinées aux macromolécules dans la zone de Golgi et que d'autre part une synthèse d'hydrocarbones apparaît dans le complexe de Golgi. Cela signifie que les molécules protéiques provenant de l'ergastoplasme ne font qu'acquérir leur taille spécifique dans le complexe de Golgi, mais sont également combinées à cet endroit avec des hydrocarbones.

2. *Noyau.*

A l'intérieur du noyau, la densité en grains la plus élevée est trouvée sur la membrane nucléaire, pour la raison essentielle que la chromatine est attachée à la membrane nucléaire.

Dans le reste du noyau excepté le nucléole les grains sont localisés préférentiellement sur les structures chromatiques colorables, tandis que les zones non colorées du noyau contiennent juste en tout quelques grains.

Sur les chromosomes, les grains apparaissent situés davantage sur le bord chromosomique que le corps du chromosome.

Le transport de protéines marquées du noyau au cytoplasme ou vice versa, n'a pas été observé dans les cellules d'animaux adultes. Toutefois le transport de protéines cytoplasmiques au noyau ne doit pas être exclus.

Dans des cultures cellulaires, des migrations sont observées ; en particulier un courant de protéines radioactives a été observée du cytoplasme dans le noyau dans les cellules infectées par du virus mais pas dans les cellules non infectées. Plusieurs recherches de ce type avec des noyaux isolés et des études enzymatiques indiquent qu'une certaine synthèse protéique doit avoir lieu dans le noyau.

3. *Le nucléole.*

Des résultats contradictoires ont été obtenus avec le marquage du nucléole. Des autoradiogrammes de tissus animaux ont toujours montré un marquage plus dense sur la chromatine associée au noyau.

Pour des cellules somatiques d'animaux adultes, toutes les observations rapportent une très faible incorporation d'aminoacides. Il semblerait que la synthèse nucléaire des protéines dépende peut-être de l'état fonctionnel de la cellule.

B) La thymidine précurseur spécifique de la synthèse de l'A.D.N.

Les premières études sur le métabolisme de l'A.D.N. furent effectées à la thymidine marquée au 15 N puis au 14 C. Mais de grands progrès furent réalisés quand Hughes en 1957 utilisa le tritium pour marquer la thymidine. La spécifité de la thymidine et la haute résolution autoradiographique du tritium a fait de ce composé un outil très souvent utilisé dans l'étude du métabolisme de l'A.D.N. et de tous les problèmes de prolifération cellulaire.

Des images autoradiographiques des cellules marquées à la thymidine tritiée montrent un marquage très distinct du noyau

cellulaire ou de chaque chromosome isolé avec à peu près aucune dispersion des grains sur les bords de ces structures cellulaires.

On a observé que de faibles quantités de radioactivité dans le D.N.A. du tissu fixé, ou dans les formes mono di triphosphaté ou d'autres substances peuvent simuler le marquage de l'A.D.N. Toutefois Fick et Paran (1947) et Amano (1959) purent démontrer que le déplacement du D.N.A. par traitement à la désoxyribonucléase des préparations éliminait complètement la réaction autoradiographique sur les noyaux après injection de thymidine tritriée, mais que la ribonucléase n'a aucun effet.

Incorporation de la thymidine marquée dans le cytoplasme.

A cause de la spécifité de la thymidine comme précurseur du D.N.A. et de la limitation du marquage au noyau observée dans la plupart des autoradiogrammes, l'incorporation de la thymidine marquée dans le cytoplasme rapportée par plusieurs chercheurs fut acceptée avec hésitation et scepticisme et considérée comme un artefact. Toutefois, l'incorporation cytoplasmique de la thymidine tritiée fut définitivement démontrée chez Lilium longiflorum où le transport du D.N.A. marqué du noyau au cytoplasme peut être exclus puisque le marquage cytoplasmique apparaît dans les cellules où les noyaux ne sont pas marqués (Takats, 1960). L'analyse chromatographique de l'extrait de ces substances montre qu'une partie de cette activité est dûe à la dégradation de produits tels que B.A.I.B.A. (acide β aminoisobutyrique) et B.U.I.B.A., acide β uréidobutyrique) mais n'apparaît pas pour tout le marquage cytoplasmique (Tarrats et Smollic, 1963).

L'incorporation cytoplasmique de la thymidine tritiée a été également observée chez Amoebaproteus bien qu'il n'y ait aucune information sur la nature chimique de la substance marquée et sa sensibilité à la désoxyribonucléase.

L'incorporation se fait aussi bien en présence qu'en l'absence de noyau.

Une corrélation entre la localisation des granules contenant de l'acide nucléique microscopiquement détectable et les molécules acido insolubles et sensibles à la desoxyribonucléase suggère que la synthèse cytoplasmique du D.N.A. chez Amoebaproteus apparaît en association avec ces particules qui se multiplient en position intra-cellulaire.

Par application de l'autoradiographie en microscopie électronique, ces particules furent identifiées dans le cytoplasme comme sites de précurseurs d'incorporation de l'A.D.N. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle ces particules sont autoréplicables dans le cytoplasme.

Les méthodes autoradiographiques en cytochimie

Dalgaard a utilisé une technique modifiée de Gomori dès 1948 en vue de localiser la phosphatase dans les tissus. Des préparations tissulaires furent incubées avec du glycérophosphate marqué au P 32 et du nitrate de calcium. Dans les travaux primitifs, la quantité de phosphate de calcium marqué était mesurée avec un compteur Geiger-Müller. L'avantage de cette méthode consiste dans la simplicité de la mesure. Plus récemment, Hempel (1963) traita des préparations de peau de Souris avec de la n-phényl maléiamide tritiée en vue de localiser et de doser des groupements sulfhydryl. Cette substance se couple aux groupements sulfhydryl qui sont alors localisés et déterminés quantitativement par comptage de grains en autoradiographie de haute résolution. Barnard et Ostrowsky purent localiser l'acétylcholinestérase à l'intérieur des plaques motrices du diaphragme de Souris en utilisant la réaction à la diisopropanylphosphorofluoride tritiée et en suivant la démonstration autoradiographique de la distribution du tritium dans la préparation. Avec la méthode d'inhibition de marquage Ostrowsky et coll. (1964) étudièrent la distribution des estérases non spécifiques dans le rein de Souris. Cette méthode de « coloration » des groupements chimiques ou des enzymes avec des substances marquées au tritium est très prometteuse et peut être appliquée dans les cas où des méthodes de coloration à proprement parler ne sont pas utilisables.

L'autoradiographie en microscopie électronique

Bélanger (1954), Liquier-Milward (1956) et Obrien et George (1959) furent les premiers à appliquer la méthode autoradiographique en microscopie électronique.

Caro et Palade (1961-1964) montrèrent par l'utilisation de la leucine tritiée sur le pancréas de jeune marsouin que le réticulum endoplasmique est le siège de la synthèse des albumines et que les protéines synthétisées dans la cellule subissent des transformations au niveau de l'appareil de Golgi.

De même la cystine marquée au 35 S fut utilisée dans l'étude du métabolisme du système pileux, comme l'iode 125 dans celui de la thyroïde.

L'utilisation de l'autoradiographie en microscopie électronique, ne diffère pas fondamentalement de son utilisation en microscopie optique. Quand on combine l'autoradiographie et la microscopie électronique, on utilise des coupes ultrafines et des émulsions consistant en une couche uniformément distribuée de cristaux de bromure d'argent. Des considérations théoriques ont montré que le pouvoir de résolution géométrique dépend de l'épaisseur de la coupe et de celle de l'émulsion aussi bien que de la distance entre les deux. Si les deux ont la même épaisseur et sont en contact étroit, le pouvoir de résolution est approximativement égal à l'épaisseur de la coupe ou de l'émulsion pourvu que la pénétration des particules soit supérieure à l'épaisseur maximale de celles-ci. Cela est vrai pour des coupes relativement épaisses préparées pour l'observation au microscope optique, mais cela l'est également pour des coupes extrêmement fines utilisées en microscopie électronique.

CONCLUSION

Application d'une méthode d'intérêt général à l'histologie, l'histoautoradiographie apparaît comme une technique susceptible de donner à celle-ci, et aux études biologiques en général, une rigueur scientifique accrue. Considérée longtemps comme une curiosité de laboratoire, de nombreuses études ont fait d'elle une méthode confirmée de la recherche scientifique. Ses perspectives nouvelles d'utilisation en cytochimie et en microscopie électronique permettent d'espérer dans les prochaines décennies une analyse très fine du métabolisme cellulaire et plus précisément d'établir la correspondance entre des processus biochimiques particuliers et des structures cellulaires données. Ses perspectives d'utilisation en « histochimie pathologique » semblent plus immenses encore. L'Histoautoradiographie devrait permettre en effet d'étudier toute déviation d'une chaîne métabolique en relation avec une lésion morphologique subcellulaire. Dans cette perspective, son application la plus évidente paraît alors se situer dans la recherche en cancérologie.

Vu: Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire, Rapporteur,
VAN HAVERBEKE

Vu: Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire,
R. FLORIO

Vu: Le Président de la Thèse,
DOUSTE-BLAZY

Vu: Le Président de l'Université Paul Sabatier,
L. LARENG.

N° 432

Vu et permis d'imprimer.

Toulouse, le 10 mars 1971.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université:
C. CHALIN.

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES GENERAUX SUR L'AUTOHISTORADIOGRAPHIE

SCHULTZ (B.), **Physical techniques in biological research Volume III B Autoradiography at the cellular level,** Academic Press Arthur W. Pollister, New York-London, 1969.

YAGULA (H.), **Radioactive measurements with nuclear emulsions,** Wyley et Sons, New York.

FONDEMENTS SCIENTIFIQUES DE LA TECHNIQUE AUTOHISTORADIOGRAPHIQUE

LEFORT (A.), **Les radiations nucléaires,** Presses Universitaires de France, Paris, 1959.

ROCHICCIOLI (C.), **Les isotopes,** Presses Universitaires de France, Paris, 1964.

ARTICLES TECHNIQUES

Les éléments de la technique histoautoradiographique, par M. F. LUDWIG.

Détection des éléments radioactifs par la technique photographique l'autoradiographie, par M^{me} Henriette FARAGGI.

L'utilisation des isotopes en microscopie électronique (HANSPETER ROHR) de l'Université de Fribourg en Brisgau.

Zajdela Journal de radiologie 33, n° 9.10.1952, p. 40.

Mapigault Laboratoire, 1952, n° 6, p. 20.

A Kuhn Laboratoire, 1952, n° 6, p. 27.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

ETUDE GENERALE ET THEORIQUE DE L'AUTORADIOGRAPHIE 13

I. - ETUDE DES DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENT UTILISÉS 13
- A) Les particules.
- B) Les particules (électrons).
- C) La capture K et la transition isométrique.

II. - PROCESSUS PHOTOGRAPHIQUE 16

III. - EMULSIONS AUTORADIOGRAPHIQUES 17
- A) Caractéristiques.
- B) La réponse autoradiographique de l'émulsion.
- C) L'effet d'évanouissement ou « fading effect ».

IV. - LA RESOLUTION AUTORADIOGRAPHIQUE 20
- A) Théorie.
- B) Facteurs influençant la résolution autoradiographique.
  1. Facteurs géométriques.
  2. Energie du rayonnement.
  3. Taille des grains de l'émulsion.
  4. L'exposition.

V. - ADMINISTRATION DES ISOTOPES 24
- A) Considérations générales sur les quantités d'isotopes à injecter.
- B) Effet de la dose de rayonnement.
- C) Distribution de la microdose.
- D) Dose de rayonnement avec le tritium.

VI. - VOILE DE FOND ET ARTEFACTS 26
- A) Facteurs influençant le voile de fond.
- B) Détermination du voile de fond.
- C) Artefacts.

VII. - AUTORADIOGRAPHIE QUANTITATIVE 28
- A) Problème.
- B) Analyse quantitative des autoradiogrammes.
  1. Comptage des grains.
  2. Comptage des traces.
  3. Détermination photométrique de la densité optique.

C) Nombre de grains produits par processus de désintégration.
D) Autoradiographie quantitative au tritrium.
1. Influence de la self-absorption.
2. Influence de l'absorption.

TECHNIQUES AUTORADIOGRAPHIQUES 35

I. - PREPARATION DU TISSU 35

A) Fixation du tissu pour l'autoradiographie.
1. Influence du fixateur sur le contenu de la radioactivité.
2. Fixation différentielle.
B) Extraction différentielle des tissus.
1. Acides nucléiques.
2. Protéines.
3. Sulfomucolysaccharides.
C) Préparation de Frottis.
D) Préparation de coupes d'os non décalcifiés.
E) Epaisseur des coupes.

II. - TECHNIQUE D'APPLICATION DES EMULSIONS PHOTOGRAPHIQUES 38

A) Technique du film « Stripping ».
B) Technique de l'émulsion liquide.
1. Couche d'émulsion mince.
2. Couche d'émulsion épaisse.
C) Technique du double marquage.
1. Couche d'émulsion épaisse.
2. Double couche d'émulsion.

III. - EXPOSITION 41

IV. - DEVELOPPEMENT ET FIXATION 42

V. - COLORATION 42

A) Coloration avant l'application de l'émulsion.
B) Coloration à travers l'émulsion.

VI. - AUTORADIOGRAPHIE DES SUBSTANCES HYDROSOLUBLES 43

A) Méthode de précipitation.
B) Méthode de lyophilisation.
C) Méthode de « freeze-substitution ».
D) Techniques utilisant des coupes à congélation et de basses températures d'exposition.

APPLICATION DES DIFFERENTS ISOTOPES 45

I. - L'IODE 131 ET L'IODE 125 45

A) Le métabolisme de l'iode de la thyroïde.
B) Substances marquées à l'iode 131.
1. Hormones.
2. Antigènes et anticorps.

II. - LE SOUFRE 35 48

A) Métabolisme des sulfomucolysaccharides chez l'animal.
1. Cartilage.
2. Os.
3. Tissu conjonctif.
4. Autres tissus.
5. Les cellules secrétant du mucus.

III. - LE PHOSPHORE 32 53
A) Formation et minéralisation des os et des dents.
B) Le phosphore 32 comme marqueur des composés chromés particuliers.

IV. - LE CARBONE 14 54

V. - LE FER 59 57
A) Formation des cellules de la lignée rouge.
B) Assimilation des différents tissus.

VI. - LE CALCIUM 45 59
A) Minéralisation des os.
B) Minéralisation des dents.
C) Le 45 CA dans les autres tissus.

VII. - STRONTIUM 90, STRONTIUM 89 ET STRONTIUM 85 61

VIII. - AUTRES ISOTOPES 61
A) Terres rares.
B) Eléments transuraniens.
C) Autres éléments.

IX. - CATIONS ET ANIONS HYDROSOLUBLES 63

X. - LE TRITIUM 3 H 64
A) Synthèse intracellulaire de protéines.
1. Le cytoplasme.
2. Noyau.
3. Le nucléole.
B) La tymidine précurseur spécifique de la synthèse de l'A.D.N.
1. Incorporation de la thymidine marquée dans le cytoplasme.

LES METHODES AUTORADIOGRAPHIQUES EN CYTOCHIMIE 67

L'AUTORADIOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 68

CONCLUSION 69

BIBLIOGRAPHIE 71

TABLE DES MATIERES 73